

Relaciones serológicas entre las bacterias del género *Salmonella* y las bacterias «Fermentadoras lentas de lactosa»

POR EL

PROFESOR DR. JOSE JULIO MONTEVERDE

INTRODUCCION

El tema a tratar implica la consideración de las bacterias del género *Salmonella*, Lignières 1900 y sus relaciones serológicas con un grupo que comprende una serie de tipos fermentativos que en la actualidad no es posible ubicar con precisión dentro de la sistemática. Entre estos «Paracolibacilos» se considera de manera provisoria a un gran número de bacterias que pueden fermentar en forma constante y relativamente rápida la lactosa, hecho que las acercaría a los integrantes de los géneros *Escherichia* y *Aerobacter*. Existe otro grupo dentro de los ya mencionados «Paracolibacilos» que comprende a bacterias que fermentan en forma irregular, tardía o debilmente la lactosa, sobre el que recae nuestro presente estudio

Deseamos aclarar que en este trabajo no se harán consideraciones sistemáticas «in extenso» relacionadas con este grupo de «Paracolibacilos» si es que algún nombre provisorio hemos de darles, dicha tarea nos parece aventurada en el momento actual debido principalmente a que los datos disponibles son tan escasos que casi con seguridad en lugar de aclarar dudas se contribuye con cada intento a aumentar la confusión. El problema sistemático es, sin duda, sumamente escabroso y mientras no se posean mayores elementos de juicio para intentar su solución nos parece poco probable obtener éxito.

Consideramos también que dentro de la terminología existente no

posemos otra alternativa que adoptar algunos términos que el uso ha sancionado y el de «Paracolibacilos» para referirnos al conjunto, como así el de «Fermentadores lentos» como una fracción de éstos, pueden servirnos para nuestro propósito no sin dejar de llamar la atención que dichos términos son susceptibles de sufrir las más profundas modificaciones.

No hemos creído oportuno, por lo inseguras, adoptar alguna de las clasificaciones propuestas y menos aún suponer que los «Paracolibacilos» se pueden ubicar en la sistemática entre tal o cual género bacteriano conocido. De lo que creemos estar ciertos es en sostener que este grupo bacteriano necesita una seria revisión a la luz de los actuales conocimientos de que dispone la ciencia bacteriológica.

El presente trabajo es esencialmente un estudio serológico y por lo tanto sólo consideraremos una parte del problema ya que es fácil comprender que no sería sensato abordarlo en conjunto pues existen serios obstáculos. Siguiendo una tarea metódica producto del esfuerzo de muchos investigadores se podrá ir esbozando el esquema serológico de estos organismos y entonces contando con estos aportes es probable el logro de una ordenación aceptable y recién entonces considerar, con gran margen de seguridad, las relaciones de este grupo con otros importantes Géneros bacterianos, sobre todo aquellos que agrupan especies dotadas de poder patógeno.

Aparte de la importancia teórica, existen razones prácticas para encarar el estudio detenido de los «Paracolibacilos» a la brevedad. La ciencia bacteriológica aplicada a la clínica necesita resolver con claridad las diferencias entre las bacterias patógenas intestinales y los «Fermentadores lentos de lactosa» en tal forma que del laboratorio bacteriológico partan datos concretos en el menor tiempo compatible con la iniciación de una terapéutica adecuada. Casi parece innecesario hacer resaltar que, si al lado de la ausencia temporaria de la fermentación de la lactosa por parte de estas bacterias y de la frecuente comunidad de características bioquímicas, especialmente sobre aquellas que se utilizan como de «orientación preliminar», se suma la posesión de relaciones antigénicas con Géneros bacterianos importantes, entonces el problema cobra una magnitud que es imposible desconocer.

ANTECEDENTES

Existe en la literatura correspondiente una gran cantidad de trabajos que se relacionan independientemente a las bacterias del género *Salmonella* por un lado — y a los «Paracolibacilos» por otro.

Los que se refieren a las relaciones serológicas son, comparativamente con los precedentes, sumamente escasos aunque es necesario hacer resaltar que algunos excelentes trabajos de estos últimos años consideran el problema a la luz de conocimientos y técnicas más modernas con lo que la cuestión ha de cobrar, sin duda, un vigoroso impulso.

En la bibliografía argentina no hemos encontrado ninguna contribución que se relacione directamente con el tema que aquí tratamos — aunque no queremos dejar pasar por alto el trabajo de Sosa G. (1942) (1) que encara el estudio de los «Fermentadores lentos de lactosa» desde el punto de vista de la higiene del agua y que es uno de los últimos que han aparecido.

Nuestra atención se ha dirigido muy especialmente hacia aquellos trabajos que tratan las relaciones serológicas entre «Salmonelas» y «Paracolibacilos» o «Fermentadores lentos» y como es natural hemos dado atención preferente a aquellos en que la parte serológica ha sido tratada con atención especial.

Kristensen, Bojlen y Kjaer (1935) (2) realizan una investigación sistemática de un grupo bacteriano que consideran ubicado entre los «Colibacilos» y los «Paratíficos» los que por lo general reciben la designación de «Gérmenes azules» o «Grupo intermediario» o «Paracolibacilos». Kristensen y col., adoptan, por considerarlo adecuado, el término: «Paracolibacilos» y su trabajo consiste en una ordenada selección en donde las reacciones bioquímicas ocupan el primer plano. Con todo, realizan una útil contribución al estudio serológico y encuentran sobre 1004 cepas en estudio, 164 que son aglutinadas frente a sueros somáticos preparados con distintas salmonelas, por lo general en forma parcial y en contadas ocasiones en forma franca (se trata de cepas mantenidas cerca de 3 años en el laboratorio). Con respecto a las aglutinaciones flagelares los mencionados autores, teniendo en cuenta la técnica por ellos seguida, consideran que es más específica para las «Salmonelas» y que en este aspecto las relaciones antigénicas no existen, ya que en ningún caso logran demostrar una aglutinación «H» franca frente a sueros anti-salmonella. Encuentran que sobre 15 cepas que bioquímicamente presentaban las características de algunas salmonelas 4 de ellas eran aglutinadas por sueros anti-salmonelas a las que agregan otras 2 cepas que se presentaron persistentemente en fase «R» y que originan la duda de si pertenecen o no al género *Salmonella*.

Kristensen y colaboradores utilizaron sueros preparados con las siguientes salmonelas: Sueros «O»; Paratyphi A. Typhimurium, Cholerae suis, Newport, London y Enteritidis. Sueros «H»; Typhi; Paratyphi A; Paratyphi B (específico), Typhimurium (no específico); Typhimurium

(específico), Kunzendorf; Cholerae-suis (específico) Newport (específico); Thompson (específico); London (específico); Virchow (específico) Oranienburg; Enteritidis var. dublin; Asiaticus y Columbensis.

Observaron que no existe una relación estable entre las características fermentativas y la aglutinación por los sueros somáticos de salmonelas. Con aquellas cepas que aglutinaron al título los sueros correspondientes, realizaron pruebas de absorción y notaron que los sueros «absorbidos» modificaban poco o nada su título al valorarlo frente a las cepas con la cual se había preparado el antisuero. Admiten la posibilidad que en algunas circunstancias las aglutinaciones observadas sean debidas a los antígenos somáticos (I, II, IV, etc.) considerados en el esquema serológico de Kauffmann-White pero también admiten la posibilidad que los que entran en juego son otras fracciones antigénicas que por razones prácticas no se incluyen en el esquema ya citado o aún antígenos englobados dentro del cómodo término «R».

Con toda certeza, a nuestro parecer, reconocen Kristensen y col., que, debido a que han realizado su investigación con cepas que han sufrido numerosos subcultivos en función de un tiempo relativamente largo, involucrando este hecho la posibilidad de variación bacteriana con todas las alteraciones conocidas en el «mosaico antigénico», convendría trabajar con cepas de reciente aislamiento sobre todo para preparar los sueros correspondientes y *realizar la absorción cruzada de las aglutinas como prueba básica* para encarar el análisis antigénico.

Sandiford (1935) ⁽³⁾ lleva a cabo en Egipto una investigación sobre las bacterias del grupo «Paracoli» que aísla con facilidad de materias fecales sometidas a los exámenes rutinarios y luego de considerar una serie de trabajos que al tema se refieren, encara el problema desde el punto de vista de los caracteres de los cultivos, propiedades bioquímicas, serológicas y patogénicas. Selecciona 41 cepas que provienen de heces remitidas para investigar disentería y agrega 6 que aísla de heces normales. Somete el material a pruebas aglutinantes frente a los siguientes sueros aglutinantes «standard»: Paratyphi A, B y C. («H» específicos), «Grupo de las salmonelas» y *B aretrycke* «O»; no encontrando ninguna relación serológica.

Roelke, (1940) ⁽⁴⁾ realiza un estudio sobre cepas que aísla de materias fecales de personas sanas y que aparecen en gran número como lactosa negativos. Encara el estudio bioquímico y serológico en comparación con *B. coli* típicos y salmonelas. Expresa que es posible apreciar entre estas bacterias «Fermentadores lentos de lactosa» los cuales a medida que pasa el tiempo disminuyen y ya al 13 día llegan a 0. Es decir que en este tiempo *se elimina la posibilidad de que un «Germen azul» pueda fer-*

mentar lentamente la lactosa. Sobre las 500 cepas con que inicia su estudio solo queda con 29, es decir el 5,8 %, que no atacan la lactosa después de 13 días de incubación, seguidas hasta 21 días. Aunque esta parte no está directamente relacionada con nuestro estudio resultan interesantes estos antecedentes por los resultados serológicos obtenidos.

Somete las cepas a la prueba de aglutinación frente a los siguientes sueros somáticos preparados con bacterias pertenecientes al género *Salmonella*: Paratyphi A; Paratyphi B; Paratyphi C; Newport; Typhi; London. Los sueros flagelares utilizados son los que siguen: Paratyphi B (b); Typhimurium (i); Typhimurium (1, 2, 3. . .); Paratyphi C (1, 4, 5. . .); Thompson (k); Paratyphi C (c); Oranienburg (mt); Postdam (en -lv); Bareilly (y-1, 5. . .); Newport (eh); Typhi (d); Enteritidis (gom); Dar-es-salaam (en-lw).

Los resultados obtenidos fueron todos negativos y hace resaltar Roelke que Kristensen y colaboradores (2) llegan a distintos resultados, posiblemente por el diferente material empleado, ya que estos hallan relaciones antigénicas con las bacterias del género *Salmonella* aunque superficiales. Expresa también Roelke que estas relaciones antigénicas originan dificultades cuando se trata de clasificar a las salmonelas en forma preliminar.

Evidentemente nos hubiera sido posible mencionar aquí una extensa serie de trabajos que enfocan el problema serológico en forma más o menos similar a la seguida por los investigadores señalados anteriormente y hemos considerado que sería incurrir en una prolongada repetición de experiencias las que con pequeñas variantes están consideradas en los trabajos precedentes. Cada una de las investigaciones que hemos citado contiene una adecuada bibliografía cuya mención no nos ha parecido imprescindible.

Para los fines que perseguimos y sin desconocer el gran valor de todos los trabajos anteriores que han preparado el camino a las investigaciones actuales sobre este tema, nos resultan muy útiles todas las contribuciones que se vinculan con los organismos del grupo «Paracoli» y sobre todo dentro de estos a los «Fermentadores lentos de lactosa» cuyos resultados serológicos estén amparados por el análisis antigénico.

A excepción de pocas investigaciones que señalaremos más adelante las relaciones serológicas entre salmonelas y bacterias que fermentan lactosa se refieren a los antígenos somáticos. Así podemos mencionar los trabajos de Habs y Arjona (1935) (6) quienes encuentran en una cepa de *E. coli* la fracción antigénica XII que como sabemos se halla presente en gran número de salmonelas (*S. typhi*, *S. paratyphi B*, etc.). Los

citados autores expresan que la relación antigénica es parcial y llaman la atención de la importancia de esta relación antigénica.

Braun, Silberstein y Velker (7) trabajando con *E. coli* logran poner en evidencia los factores IV. XII. que han sido señalados en las salmonelas del grupo B de esquema serológico de Kauffmann-White.

Posteriormente Kauffmann (9) da a conocer los resultados de sus investigaciones sobre 5 nuevos tipos serológicos de bacterias que fermentan lactosa con las siguientes fórmulas somáticas: IV. V. XII; IV. XXVII. XII; VI. VII; VI. VII y VI. . . Llama la atención que el análisis antigénico de las cepas que responden a la fórmula VI. VII demuestra que no son iguales.

Schiff, Bornstein y Saphra (1941) (8) contribuyen al estudio de las relaciones serológicas entre salmonelas y bacilos «Coli-atípicos» o «Paracolibacilos» ú organismos «Coliformes» término este último que adoptan. Describen 5 cepas de «Coliformes» que contienen antígenos «O» de salmonelas. Una de estas presenta la misma composición antigénica que *S. ondesteport* (I. VI. XIV. XXV).

En otra de las cepas estudiadas logran demostrar el complejo antigénico somático de *S. worthington* (I. XIII. XXIII). En 4 había antígenos residuales de bacterias del género *Salmonella*.

Los trabajos referentes a las relaciones antigénicas «H» aunque menos numerosos no dejan de presentar importancia, Gard (10) identifica antígenos «H» en bacterias probablemente pertenecientes al género *Escherichia* y Gard y Erikson (11) completan los estudios demostrando que en bacterias que fermentan lactosa, que según ellos pertenecen a *E. coli*, existen antígenos termolábiles «H» que se corresponden con algunos antígenos «H» que se encuentran en gran cantidad de bacterias pertenecientes al género *Salmonella* y que pertenecen a la fase 2 (1, 5. .) de muchas de estas que presentan el fenómeno de variación de fase.

Los autores utilizando la técnica de inducir artificialmente las fases flagelares por siembra en medios sólidos en presencia de suero flagelar 1,5. . no consiguen poner en evidencia en sus «coliformes» el fenómeno descrito por Andrewes (12).

Peluffo, Edwards y Bruner (6) encuentran también relaciones antigénicas «H» entre «Paracolibacilos» y «salmonelas», pero no ya sobre antígenos flagelares que interesan a la fase 2 sino que los que ellos señalan se refieren a antígenos flagelares que se encuentran en la fase 1 de *S. diüsseldorf* (13) y en *S. cerro* esta última aislada y clasificada en el Uruguay por Hormaeche, Peluffo y Aleppo (14). *S. cerro* posee los antígenos flagelares Z⁴, Z²³, Z²⁵ y *S. diüsseldorf* presenta Z⁴ - Z²⁴ es decir que ambos tienen en común la fracción Z⁴.

Peluffo y colaboradores trabajan con bacterias «Coliformes» aisladas en su mayoría de animales enfermos y también emplean el término «Paracolibacilos». En general todas las cepas de estos «Paracolibacilos» con una excepción, fermentan con lentitud lactosa y licúan lentamente gelatina. Estudian detenidamente 7 cepas las cuales resultan poseer comunidad con las fracciones antigénicas flagelares de *S. cerro* y *S. düsseldorf* y en base al análisis antigénico proponen una ordenación en 5 grupos serológicos.

Como se trata de una importante contribución nos extenderemos en algunos detalles más que servirán al lector para la adecuada comprensión del problema. Antes de proseguir insistiremos en la representación de las fórmulas antigénicas. Es sabido que en el género *Salmonella* los antígenos somáticos se expresan con números romanos desde el I hasta el XXXIV, los flagelares (fase 1) con letras minúsculas y debido al creciente número de nuevos antígenos las letras del abecedario han resultado insuficientes por lo que se apela a la letra Z con distintos exponentes; los antígenos «H» de la fase 2 se representan con números arábigos del 1 al 7 y también por letras minúsculas.

Peluffo, Edwards y Bruner estudiando las relaciones antigénicas basados en la «prueba espejo» encuentran en sus «Paracolibacilos» fracciones antigénicas importantes y resuelven, provisoriamente, expresar los antígenos «O» con letras mayúsculas y los nuevos antígenos flagelares con la letra x con distintos exponentes (se debe tener en cuenta, como lo hacen resaltar los autores que estas x nada tienen que ver con la del esquema serológico de Kauffmann-White).

Como más adelante se podrá apreciar, en el Cuadro I, los antígenos que se incorporan son : Somáticos: A, B, C y D y flagelares: x^1 , x^2 y x^3 , perteneciendo el x^1 al complejo flagelar de *S. düsseldorf* y x^2 a *S. cerro*.

CUADRO N° 1 (según Peluffo, Edwards y Bruner)

	Somáticos	Flagelares
Grupo I	XXXIII. B	Z ⁴ , Z ²³ , Z ²⁶
Grupo II	XXXIII. B	Z ¹ , Z ²⁴ , X ³
Grupo III	A B	Z ¹ , Z ²³ , X ²
Grupo IV	C	Z ¹ , Z ²⁴ , Z ²⁶
Grupo V	D	Z ¹ , Z ²⁴ , X ³
<i>S. düsseldorf</i>	VI.VIII	Z ¹ , Z ²⁴ , X ¹
<i>S. cerro</i>	XVIII	Z ⁴ , Z ²³ , Z ²⁵ , X ²

Trabajo previo de verificación

En primer término consideramos oportuno entrar en posesión de los tipos serológicos de Peluffo, Edwards y Bruner (x) con el objeto de preparar los sueros correspondientes, dispusimos también repetir en parte el trabajo de los mencionados investigadores. Con tal fin iniciamos el estudio basados en los grupos que se expresan en el *Cuadro N° 1*.

Las cepas empleadas han sido las siguientes: E 131; Rubin 14; M 74; 36.608; S 39 y «Hudson». Para nuestro gobierno hemos decidido llamarles: P², P³, P⁴, P⁵, P⁶ y P⁹. Sus respectivas fórmulas serológicas son las siguientes:

	Somáticos	Flagelares
P ²	XXXIII. B	Z ⁴ , Z ²³ , Z ²⁶
P ³	XXXIII. B	Z ⁴ , Z ²³ , Z ²⁶
P ⁴	XXXIII. B	Z ⁴ , Z ²⁴ , X ³
P ⁵	A B	Z ⁴ , Z ²⁴ , X ²
P ⁶	D	Z ⁴ , Z ²⁴ , X ³
P ⁹	C	Z ⁴ , Z ²³ , Z ²⁶

La *Salmonella cerro* y *S. düsseldorf* utilizadas corresponden a las de colección.

Con nuestro suero XXXIII preparado con *S. arizona* sometida a un calentamiento de 100°C durante 2 horas se pudo evidenciar la presencia de la correspondiente fracción antigénica en los grupos I y II. La parte flagelar (prueba orientadora) por intermedio del suero Z⁴ preparado con *S. cerro* (factor que en realidad agrupaba el complejo antigénico flagelar Z⁴, Z²³, Z²⁵). La técnica seguida para preparar estos sueros se detalla más adelante.

*Estudio serológico:**Soma.*

Ninguna de las cepas ofreció dificultades para realizar el estudio de la estructura antigénica del soma, salvo una: nos referimos a la cepa P² que corresponde a E 131 (Arizona) la cual se mostró con marcada persistencia en carácter «R». Luego de repetidas selecciones se lograron formas transitorias «S» que con toda facilidad se convertían en «R». Este fenómeno por otra parte nos ha ocurrido con *S. arizona* de nuestra colección que en contadas ocasiones se ha presentado en condiciones ade-

(x). — El doctor C. A. Peluffo entregó al autor las cepas correspondientes, cosa que obliga su agradecimiento.

cuadas como para poderla utilizar como antígeno XXXIII. Hemos comprobado, en cambio, que la cepa P³ (Rubin 14) con soma igual al de «Arizona» (XXXIII. B) funciona excelentemente para este propósito originando buenos sueros y presentando buena sensibilidad para ser aglutinada o ser empleada con fines de absorción. Como se comprenderá la cepa P³ presta gran utilidad en la preparación del factor XXXIII y en nuestras manos su comportamiento ha superado el rendimiento obtenido con las otras cepas de igual fórmula antigénica somática.

Utilizamos los sueros XXXIII; A; A. B.; C. y D. haciendo pruebas lentas y pruebas por «toques» y no hemos hallado inconvenientes entre las pruebas realizadas y el Cuadro N° 1.

Estudio de la estructura antigénica flagelar.

Antes de encarar el estudio de los antígenos flagelares resolvimos preparar sueros conteniendo factores puros por adecuadas saturaciones; los sueros que empleamos son los siguientes: Z⁴, Z²³, Z²⁶; Z²⁴, X³, Z²³, Z²⁶; Z²⁵, Z²⁶; X¹; X²; X³. Hemos hallado antígenos residuales además de los indicados en el cuadro, pero son por el momento y a fin de no complicar la notación, prácticamente despreciables.

Propiedades bioquímicas: Se confirmaron las propiedades bioquímicas señaladas. No se pudieron realizar todos los ensayos frente a los ácidos orgánicos por carecer de ellos, salvo el d-tartrato. Se observó el mismo fenómeno en el medio glicerinado de Stern, es decir reacción positiva pero nunca tan franca como la originada por *Salmonella cerro* y *S. düssel-dorf*.

La fermentación de lactosa fué estudiada con mayor detenimiento. En los cuadros de Peluffo y col., las cepas ensayadas atacan lactosa con lentitud y se señala que el subcultivo seriado disminuye el tiempo en

Suero XXXIII: Cepa inoculada: (Rubin 14) (XXXIII B. Z⁴, Z²³, Z²⁶) calentada 2 horas a 100°C. Saturado con cepa 36.608 (A. B. Z⁴, Z²³, X²).

Suero A: Cepa inoculada 36.608 (A. B. Z⁴, Z²³, X²) calentada 2 horas a 100°C. Saturado con Rubin 14 (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶).

Suero A. B.: Igual que A pero sin saturar.

Suero C: Cepa inoculada: «Hudson» (C. Z⁴, Z²³, Z²⁶) calentada 2 horas a 100°C.

Suero D: Cepa inoculada «39» (D. Z⁴, Z²⁴, X³) calentada 2 horas a 100°C.

forma tal que P², P⁹ y P⁵ que son las que requieren más tiempo para atacar lactosa llegan a producir ácido y gas a las 24 horas. Al mismo tiempo notan, al igual que otros investigadores, que en tubos cerrados la reacción se acelera.

A este respecto hemos realizado tres ensayos en serie y los resultados se expresan en el Cuadro que sigue:

CUADRO N° 2

1er. Ensayo

Cepa	Agua peptonada, lactosada (Abierto)	Agua peptonada, lactosada (Cerrado)
P ²	a ⁹ .	A ⁶ g ⁷
P ³	(a ⁷), a ⁹ , — 15.	a ⁵ , A ⁷ , — 10
P ⁴	A ⁴	a ³ , A ⁴ , a ⁷ (lactecente)
P ⁵	(a ⁸), a ¹⁰	a ¹⁴
P ⁶	a ³ , A ⁴ , — 8	a ² , A ³ , a ⁵ — 7
P ⁹	a ⁹ , A ¹¹	a ⁷ , A ^{9g}

Suero Z⁴, Z²³, Z²⁶: Cepa inoculada: P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶). Saturado con P³ calentada.

Suero Z²⁴, X³: Cepa inoculada: P⁴ (XXXIII. B. Z⁴, Z²⁴, X³). Saturado con P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶).

Suero Z²³, Z²⁶: Cepa inoculada: P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶). Saturado con P⁴ (XXXIII. B. Z⁴, Z²⁴, X³).

Suero X¹: Cepa inoculada: *S. düsseldorf* (VI. VIII. Z⁴, Z²⁴, X¹). Saturado con *S. newport* (VI. VIII. eh 1.2. ...) y con P⁴ (XXXIII. B. Z⁴, Z²⁴, X³).

Suero X²: Cepa inoculada: P⁵ (AB. Z⁴, Z²⁴, X²). Saturado con P⁵ calentada y con P⁴ (XXXIII. B. Z⁴, Z²⁴, X³).

Suero X³: Cepa inoculada: P⁴ (XXXIII. B. Z⁴, Z²⁴, X³). Saturado con P⁵ (AB. Z⁴, Z²⁴, X²) y con P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶).

Suero Z²⁶: Cepa inoculada: P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶). Saturado con P³ calentada y con *S. cerro* (XVIII. Z⁴, Z²³, Z²⁵).

Suero Z²⁵: Cepa inoculada: *S. cerro* (XVIII. Z⁴, Z²³, Z²⁵). Saturado con *S. cerro* calentada y con P³ (XXXIII. B. Z⁴, Z²³, Z²⁶).

2do. Ensayo

Cepa	Agua peptonada, lactosada (Abierto)	Agua peptonada, lactosada (Cerrado)
P ²	a ⁸	(a ¹⁴)
P ³	(a ⁸)	a g ¹ , — 7
P ⁴	A G ²	A G ² , a G ⁴ , — 8
P ⁵	(A ¹²)	a ⁵
P ⁶	a ¹ , A g ⁴ , — 8	Ag ¹ , — 5
P ⁹	(a ³), a ⁹	A ² g.

(x). — En la fermentación de la lactosa hemos utilizado medio líquido que consistía en agua peptonada, lactosa al 1 % e indicador de Andrade con campana Durham de fermentación.

Los tubos se cerraban introduciendo el tapón de algodón más o menos 1 centímetro, se adaptaba una rodaja de corcho y se cubría con parafina.

La fermentación fué observada hasta los 40 días.

Continuación del Cuadro N° 2.

3er. Ensayo

Cepa	Agua peptonada, lactosada (Abierto)	Agua peptonada, lactosada (Cerrado)
P ²	a ³	A G ²
P ³	AG ² , AG ³ , — 7	AG ² , aG ⁴ , — 7
P ⁴	AG ¹	AG ² , AG ³
P ⁵	a ⁴	a ³ g
P ⁶	(a ³), a ⁴ , — 8	a ³ g, — 5
P ⁹	A ² g	A ² g

AG: Significa abundante producción de ácido y gas.

A : Significa abundante producción de ácido solamente.

a : Significa débil producción de ácido.

g : Significa escasa producción de gas.

El número que acompaña a cada abreviatura indica el día en que se produce el fenómeno.

Con respecto a la licuación de la gelatina nuestros resultados no son idénticos, aunque debemos hacer constar que hemos realizado los controles incubando a 37°C.

En nuestras manos, como se podrá apreciar al observar el Cuadro en donde se señalan los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, sólo la cepa P⁹ (Hudson) licua tardíamente la gelatina.

Poder patógeno: En realidad no hemos realizado pruebas bien definidas acerca del poder patógeno de estas cepas aunque consideramos de interés mencionar los hechos que siguen. La inoculación endovenosa de las cepas

P³ y P⁴ condujo a la muerte, con bastante regularidad, a los conejos. Este poder patógeno lo hemos comprobado en 4 oportunidades para la cepa P³ que produjo la muerte de los conejos luego de la 2^a, 3^a, 2^a y 2^a inoculación del antígeno. El volumen inoculado la 1^a vez fué $\frac{1}{2}$ c.c. para los dos primeros animales, luego se disminuyó a $\frac{1}{4}$ c.c. y en esta forma murieron los dos restantes. El antígeno se dosificó por comparación nefelométrica (Nefelómetro de Mac Farland), para los dos primeros animales opalescencia del tubo N° 1, para los dos últimos 0,25 del tubo N° 1.

En el caso de la cepa P⁴ ocurrió un fenómeno parecido pues murieron 4 animales inoculados en forma similar a la realizada con P³. Los sujetos murieron después de la 6^a, 3^a, 2^a y 1^a inoculación.

Las comprobaciones precedentes se realizaron durante el curso de la preparación de los sueros correspondientes y tanto P³, como P⁴ fueron inyectados en suspensión formolada pues el objeto era preparar sueros flagelares.

Hemos realizado también otro control sobre las cepas *E 134*, *E 135*, *E 136*, *E 137*, *E 138*, *E 139*, *E 140*, *E 141* y *E 142*, que corresponden respectivamente a *S. coli 1* (2624-36), *S. coli 1* (5396-38), *S. coli 1* (6179-36) de fórmula serológica XXXI. Vi .1.5. . . ; *S. coli 2* (491-36).

Con estas cepas preparamos los sueros XXXI, XXXII, Z²⁰, Z²¹, Z²². El antígeno *Vi* fué preparado siguiendo en sus lineaciones generales la técnica de Craigie y Brandon ⁽¹⁵⁾ modificada en parte por Peluffo ⁽¹⁶⁾.

Consiste en sembrar una cepa que posea antígeno *Vi* en agar nutritivo que se incuba a 37°C. durante 24 horas. De este cultivo se siembra una pequeña cantidad en caldo común al que se le agrega 10 % del suero anti «O» correspondiente, se incuba a 37°C. durante 1 hora y luego se centrifuga a 1000 r.p.m. durante 15 minutos aproximadamente. Tratando de

-
- Suero XXXI.* Cepa inoculada *S. coli 1* calentada 2 horas a 100°C.
Suero XXXII. Cepa inoculada *S. coli 2* calentada 2 horas a 100°C.
Suero Vi. Cepa inoculada *S. ballerup XXIX-Vi* (seleccionada *Vi* dominante) antígeno alcoholizado.
Suero Z²⁰. Cepa inoculada *S. coli 3* (IV. V. XII. Z²⁰) saturado con *S. coli 3* calentado.
Suero Z²¹. Cepa inoculada *S. coli 4* (IV. XII. (XXVII). Z²¹) saturado con *S. coli 4* calentada.
Suero Z²². Cepa inoculada *S. coli 5* ((I). VI. XIV. XXV. Z²²) saturado con *S. coli 5* calentada.
S. coli 2 con fórmula XXXII. 1.5; *S. coli 3* (Zurich) IV. V. XII. Z²⁰;
S. coli 4^b, *S. coli 4^{ka}* IV (XXVII) XII. Z²¹ - y *S. coli 5* [(I). VI. XIV. XXV. Z²²].

no imprimir movimiento al contenido del tubo, se vuelve a incubar a 37°C. durante 1 hora y nuevamente se centrifuga el cultivo a 1000 r.p.m. durante 15 minutos. Con el ansa se retira una porción superficial del líquido sobrenadante y se procede a realizar un aislamiento superficial por estrías sobre agar nutritivo contenido en una caja de Petri. Luego de 24 horas de incubación a 37°C. ya es posible apreciar la diferencia en el aspecto de las colonias y realizar una adecuada selección. Las colonias que están integradas por bacterias que poseen antígeno *Vi* son más grandes y más opalescentes que las que corrientemente se observan en las restantes salmonelas que no poseen *Vi*. Peluffo, modifica en parte dicha técnica y consigue buenos resultados. Consiste la modificación en sembrar caldo simple con un cultivo sobre agar nutritivo de 24 horas de incubación a 37°C. de la cepa poseedora de antígeno *Vi*. El caldo sembrado permanece a 37°C. durante 4 horas y luego se centrifuga a 1000 r.p.m., con ansa se retira una porción del líquido sobrenadante y se realiza un aislamiento sobre agar nutritivo contenido en caja de Petri. Luego de 24 horas de incubación a 37°C. es posible observar dos tipos de colonias. Interesan aquellas más grandes y opalescentes. Hemos utilizado con buenos resultados este último proceder.

Las reacciones bioquímicas se realizaron simultáneamente con las cepas P², P³, P⁴, P⁵, P⁶, y P⁹, insistiendo siempre sobre la fermentación de lactosa. En el cuadro N° 3 que sigue exponemos nuestras pruebas y resultan, a nuestro parecer muy interesantes las obtenidas a 37°C y a 44°C.

Es posible notar también que en las cepas P², P³, P⁴, P⁵, P⁶, P⁹, E 136, E 139, E 140, E 141 y E 142 se cumple la correlación negativa VP.—RM.

Las cepas E 137 y E 138 poseen también un interesante comportamiento bioquímico ya que fermentan lactosa y dulcita con facilidad originando ácido y gas ya a las 24 horas de incubación a 37°C. En caldo Mac-Conkey incubado a 44°C. durante 48 horas (Prueba de Eijkmann modificada por Wilson) producen ácido y gas. Enturbian al medio sintético citratado de Koser, dan reacciones de Rojo de Metilo y Vogues-Proskauer negativas.

Las cepas E 134, E 141 y E 142 licúan gelatina.

PARTE EXPERIMENTAL

Material de estudio: Los «Fermentadores lentos» que hemos estudiado han sido aislados de líquido cloacal, agua del Río de la Plata, heces hu-

Cepa	Lactosa	Dulcita	SH ²	d-tartrato	L. T.	Gelatina	Ko-ser	R.M.	V.P.
P 2	(a ²⁰) a ²³	— ³⁰ z	+ ¹	— ¹⁰	Azul ³ Coag. ¹⁰ Deco.. ¹¹	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
P 3	(a ¹¹) (a ¹²) A ²²	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Azul ³ Coag. ¹⁶	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
P 4	(a ¹¹) A ²²	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Azul ⁷ Coag. y Decol. ¹⁵	— ⁶⁰	— ¹ + ³	+	—
P 5	(a ³⁰) a ⁴⁰	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Azul ³ Coag. ¹⁴	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
P 6	AG ³	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Azul ³ Coag. y Decol. ¹⁰	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
Hudson	(a ⁸)	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Azul ³ Azul ¹⁵	Licúa ³⁰	+ ¹	+	—
E 134	ag ¹ AG ²	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ² Decol. ³	Licúa ³⁰	— ¹ + ³	+	—
E 135	AG ¹	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Coag. y Decol. ²	— ³⁰	+ ¹	— +	—
E 136	ag ¹ AG ²	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Decol. ²	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
E 137	ag ¹	AG ¹ aG ⁴	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Decol. ²	— ⁶⁰	+ ¹	— +	—
E 138	AG ¹	AG ¹ (a)G ⁴	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Decol. ²	— ⁶⁰	+ ¹	— +	—
E 139	A ¹	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Decol. ²	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
E 140	AG ¹	— ³⁰	+ ¹	+ ¹⁰ (Parcial)	Coag. y Decol. ¹	— ⁶⁰	+ ¹	+	—
E 141	AG ¹	— ³⁰	+ ¹	— ¹⁰	Coag. ¹ Decol. ²	Licúa ²²	+ ¹	+	—
E 142	(a ⁷) ag ⁹ AG ¹⁰	— ³⁰	+ ¹	— ¹³	Decol. ² Coag./	Licúa ²⁰	+ ¹	—	+

X : Significa que no se obtuvo desarrollo.

(a²⁰) : Significa que produce débil acidificación del medio que ocupa la campana de fermentación después de 20 días de incubación.

a²³ : Significa que produce débil acidificación del medio después de 23 días de incubación.

A¹ : Significa abundante producción de ácido.

g¹ : Significa escasa producción de gas en un día de incubación.

G¹ : Significa abundante producción de gas en un día de incubación.

Decol. : Decolora.

Coag. : Coagula.

Mac Conkey a 37°C	Mac Conkey a 44°C	Indol	Glu- cosa	Ram- nosa	Treha- losa	Xi- losa
Fluo- rescente	Ag ² (pH 5) 5° día pH 7	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Fluo- rescente	ag ¹ (pH 6) 5° día pH 7	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Fluo- rescente	ag ² (pH 5) 5° día pH 5	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Fluo- rescente	ag ¹ (pH 5) 5° día pH 6,5	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Ag ²	ag ² (pH 5) 5° día pH 6	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Fluo- rescente	AG ² (pH5) 5° día pH 7	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
ag ¹ AG ²	X	+ ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Ag ¹ AG ²	X	+ ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
ag ¹ Ag ²	X	+ ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
ag ¹ AG ²	Ag ¹ (pH 4) 5° día pH 4,5	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
AG ²	Ag ¹ (pH 4) 5° día pH 4	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Ag ²	X	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Ag ²	X	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Ag ¹ AG ²	X	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹
Fluo- rescente	a(pH 5) 5° día pH 5	— ²	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹

manas y excrementos de aves, durante la realización de otros trabajos de investigación (34) (x) (xx).

Hemos seleccionado los que con más facilidad pueden ser motivo de confusión con las especies del género *Salmonella* y debido a esta circunstancia se eliminaron provisoriamente aquellos que a pesar de poseer la propiedad de fermentar tardíamente lactosa presentaban otras características distintas como ser: fermentación rápida de sacarosa o abundante producción de indol, etc.

El total de «Fermentadores lentos de lactosa» sometidas a estudio ha sido 176 recayendo el estudio serológico sobre 54 (ver adelante).

Hemos tratado de utilizar microorganismos de reciente aislamiento o de escasos subcultivos.

Aislamiento: En trabajos anteriores (18-34) hemos expuesto, ya con detalle, muchos de los métodos que adoptamos aquí; con todo diremos que nuestros hallazgos provienen del estudio de colonias sospechosas desarrolladas en agar-lactosa-tornasol, medio que usamos habitualmente en el aislamiento de salmonelas y shigellas.

Para el caso de las muestras de agua y líquido cloacal el procedimiento ha sido el siguiente: todas las muestras fueron sometidas a un enriquecimiento previo en medio de Kauffmann al tetrathionato durante 24 horas a 37°C.; posteriormente los aislamientos se realizaron en medio de Kristensen, Lester y Jürgens y agar-lactosa-tornasol.

Cuando se trataba de excrementos se realizaba conjuntamente con el enriquecimiento, una siembra directa en los medios sólidos ya citados.

El agar-lactosa-tornasol (L.T) y el agar con verde brillante (Kristensen, Lester y Jürgens (V.B.) se incubaron a 37°C. durante 24 horas procediéndose luego a la interpretación de los resultados.

Como ya lo hemos expresado en otros trabajos, también aquí hemos decidido proseguir las investigaciones sobre colonias aisladas en L.T. por ser un medio prácticamente carente de sustancias inhibitoras cosa que no ocurre con el V.B. donde es frecuente hallar más de una especie bacteriana en una colonia sospechosa.

Las colonias azules, en medio L.T. de 1 a 3 mm de diámetro, con bordes netos, superficie elevada y algo transparentes (luz transmitida) fueron consideradas sospechosas.

Pruebas bioquímicas preliminares: Toda colonia sospechosa fué sometida a las siguientes pruebas bioquímicas de orientación: fermentación de

(x). — Monteverde, J.J. y Simeone, D. H. En preparación (Fac. Agr. y Vet.).

(xx). — Ferramola, R., Monteverde, J.J. y Leiguarda, R. En preparación Lab. O.S.N.).

glucosa, manita, lactosa, sacarosa, producción de *indol* e *hidrógeno sulfurado*.

Luego de un período de incubación de 24 horas a 37°C ya es posible sospechar en la probable existencia de salmonelas, shigellas, proteus, alcaligenes, etc.

Así por ejemplo: se pensará en una posible salmonela si nos encontramos con una cepa que fermenta glucosa y manita con ácido y gas, no ataca sacarosa y lactosa, produce hidrógeno sulfurado y es indol negativa. Lógicamente para afirmar que así sea, es necesario estudiar su morfología, reacciones tintoriales, estructura antigénica y poder patógeno. En una palabra sus propiedades serán coincidentes con la definición genérica recomendada en el Tercer Congreso Internacional de Microbiología realizado en los EE.UU. de Norte América en 1939 (17) que dice así: «*Bastones Gram negativos, no esporulados, generalmente móviles con flagelos peritricos, excepcionalmente inmóviles, que crecen bien en los medios corrientes de cultivo, no fermentan sacarosa, ni coagulan la leche, raramente fermentan la lactosa, licúan gelatina o producen indol. Atacan regularmente la glucosa con formación de ácido y gas y a veces ácido solamente. Patógenas para el hombre, animales o ambos y que poseen los antígenos del grupo*».

Fermentación de hidratos de carbono: La fermentación de los hidratos de carbono se ha estudiado utilizando agua peptonada con indicador de Andrade al 1 % y el azúcar correspondiente en la proporción del 0,5 %. En el estudio de la fermentación de lactosa además de las prueba precedentes se ensayó la punción en agar al 0,75 % con agregado de azul de bromotimol como indicador de acidez y el azúcar al 0,5 %.

Las reacciones preliminares de fermentación se siguieron durante 15 días seguidos de incubación a 37°C con lecturas parciales cada 24 horas. (Salvo el tubo conteniendo lactosa que por lo general se seguía 25 a 30 días).

Los tubos conteniendo medio líquido iban provistos de campanita de fermentación (pH 7,2).

Producción de indol: La investigación de indol se ha efectuado sobre cultivos en agua peptonada (Bacto peptona) de 24 horas de incubación a 37°C. (todas las pruebas se repitieron después de 48 horas de incubación a 37°C).

Como reactivo se usó la solución de *p. dimetilaminobenzo-aldehida* en alcohol con ácido clorhídrico (Sol. N° 1) y Sol. acuosa saturada de persulfato de potasio (Técnica de Ehrlich-Böhme). La presencia de coloración rojo violada indica reacción positiva.

Producción de hidrógeno sulfurado: Hemos seguido la técnica precon-

zada por Zo Bell y Felthman (19) que consiste en colocar suspendida entre el tapón de algodón y la pared interna del tubo una tira de papel de filtro impregnada en Sol. acuosa saturada de sub-acetato de plomo (esterilizada y seca) en un tubo conteniendo agua peptonada con productos sulfurados en cantidad, condición que conviene comprobar realizando un control sembrando una bacteria que forme H_2S en poca cantidad. El ennegrecimiento del papel indica que el H_2S (volátil) ha dado lugar a la formación de sulfuro de plomo (negro).

Hemos utilizado para realizar esta prueba el mismo tubo conteniendo agua peptonada que destinamos a la investigación del indol lo que significa ahorro de tiempo y material.

Pruebas serológicas preliminares: Toda cepa que a las 24 horas presentaba un comportamiento similar al que citamos en el ejemplo anterior es decir: glucosa y manita ácido y gas, SH_2 positivo y lactosa, sacarosa e indol negativo era sometida a las pruebas serológicas preliminares que ayudan bastante en la orientación. Estas pruebas se realizaron siguiendo la técnica de aglutinación por «toques» que consiste en colocar en una lámina de vidrio cuadrículada (cuadrados de 2×2) una gota espesa del antígeno constituido por una suspensión en suero fisiológico al 8,5 % de un cultivo en agar nutritivo de 24 horas de incubación a $37^\circ C.$ y cuya opalescencia es 60 o 70 veces la que presenta el tubo N° 1 del Standard Nefelométrico de Mac Farland. Cada antígeno se mezclaba con un volumen igual de tres sueros polivalentes que contenían los siguientes factores aglutinantes: N° 1: IV.V. en...; III,X,XXVI.1.6...; III, XIX.g,s,t...; VI.VII.C.; VI.VIII.i; IX,XII.d; III,X,XXVI.IZ¹³; IV.V.b;l.II.

N° 2.: VI.XIV.XXV; XXVII; XX(VIII)Z⁶; I.XIII.XXIII; XVII; XXI, XXIV; XVII; Z⁴;XI.

N° 3: XXXI; XXXII; XXXIII.B.Z⁴,Z²³,Z²⁶; AB; C; D; XVIII. Z⁴,Z²³,Z²⁵; IV.V.XII.Z²⁰; I.VI,XIV,XXV.Z²²; IV.XII.XXVII.Z²¹.

Las lecturas de las reacciones se efectuaba sobre un aglutinoscopio similar al que se utiliza para la lectura de las pruebas rápidas aglutinantes destinadas al diagnóstico de la brucellosis y pullorosis.

Otras pruebas bioquímicas: Toda bacteria cuyas propiedades bioquímicas preliminares en las primeras 48 horas de incubación a $37^\circ C.$ coincidían con las que poseen las salmonelas y que además presentaba reacción positiva frente a los sueros polivalentes N° 1, N° 2 o N° 3, era sometida a las pruebas bioquímicas que a continuación se detallan las que se sumaban a las ya realizadas.

Fermentación de hidratos de carbono: Se agregaron arabinosa, dextrina, dulcita, inosita, maltosa, ramnosa, salicina, sorbita, trehalosa y xilosa,

Todos estos azúcares junto con los utilizados en las pruebas bioquímicas preliminares se incubaron durante 15 días a 37°C. con lecturas parciales cada 24 horas.

Composición del medio.

Bacto peptona.....	10 g
Agua destilada	1000 ml
Cl.Na.....	5 g (pH 6,8)

A este medio se le agrega 1 % de indicador de Andrade y 0,5 % del azúcar correspondiente. La reacción final es de pH 7,4 — 7,6. El medio se coloca en tubos con campana Durhan de fermentación.

Indicador de Andrade.

Fucsina ácida	0,5
Agua destilada	100 ml
Sol.N/1 de NaOH	Entre 16 y 30 ml

Este indicador es muy alcalino por lo que se recomienda incorporarlo cuando el medio basal está alrededor de pH 6,8 — para que el pH final sea 7,4 — 7,6.

La cantidad de NaOH que debe agregarse para decolorar la fucsina es variable (16 a 30 ml) y depende del grado de acidez de la fucsina utilizada.

Crecimiento en medio de Simmons ⁽²⁰⁾ *modificado por Hohn y Herrmann* ⁽²¹⁾.

Hemos utilizado este medio que posee como única fuente nitrogenada el fosfato de amonio con el agregado de glucosa, dulcita, ramnosa y arabinosa. Es posible observar además del crecimiento el ataque de los azúcares incorporados, por el viraje que sufre el indicador de acidez. Además se ha ensayado el medio de Simmons con agregado de citrato de sodio con el objeto de apreciar la utilización de este radical como fuente carbonada. Estos medios fueron incubados a 37°C. durante 15 días con lecturas parciales cada 24 horas.

El aspecto amarillo que presenta el medio indica su utilización y ataque del azúcar correspondiente. En el caso del Simmons — Citrato las bacterias al desarrollar liberan álcali adquiriendo el medio, que originalmente posee un tinte verdoso, un color azul intenso (positivo).

La siembra de estos medios conviene realizarla a partir de una suspensión en suero fisiológico de un cultivo en agar de 24 horas de incubación a 37°C. apenas opalescente.

Composición del medio.

1°) Solución salina:

Fosfato amónico sódico ($\text{Na}(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	1,5	g
Fosfato de potasio ($\text{K H}_2 \text{PO}_4$	1	g
Sulfato de magnesio (Mg SO_4	0,2	g
Agua destilada	1000	ml

2°) Agregar a 20 g de agar bien lavado con agua destilada durante 3 o 4 días , la solución salina, llevar 20 minutos al autoclave a 110°C. para disolver el agar. Filtrar por algodón. Repartir en frascos de 200 ml y esterilizar. Para usarlo se funde y agrega el azúcar correspondiente a razón de 0,40 g por cada 200 ml de medio. El citrato se incorpora a razón de 0,50 g. Como indicador se usa el azul de bromotimol. (Sol. alcohólica al 1,5 %) a razón de 2 cm³ cada 200 ml. Esterilizar en autoclave abierto. El medio debe tener color verde oscuro. Conservar en la heladera.

Medio de Bitter, Weigmann y Habs (22).

Se ha utilizado el medio recomendado por Bitter y col. con agregado de dulcita, glucosa, arabinosa y ramnosa. El medio conviene sembrarlo con pocas bacterias y se incuba a 37°C. durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se observa si hay desarrollo y finalmente se aprecia si se ha producido algún cambio en el pH original agregando 2 gotas de solución alcohólica de rojo de metilo al 0,5 %. Los tubos se agitan con suavidad y se observa la coloración del líquido; si es roja se considera positivo (+), las reacciones dudosas se presentan de color anaranjado (±) y siempre conviene repetir las y por último si el medio permanece de color amarillo se considera negativa.

Composición del medio.

Sol. salina:

Fosfato disódico	0,5	g
Sulfato de amonio.	1	g
Citrato de sodio	2	g
Cloruro de sodio.	5	g
Peptona.	0,05	g
Agua destilada	1000	ml

Se esteriliza a 110°C. durante 20 minutos y luego se agregan los azúcares al 1 % menos la ramnosa que va al 0,5 %.

Medio glicerinado de Stern (23).

En el medio de Stern es posible poner en evidencia la formación de ácido o de aldehído debidos a la actividad microbiana. Una vez sembrado el medio, cuyo color original es rosado muy pálido se incuba a 37°C. por espacio de 7 días (por lo general 5 días suelen ser suficientes) con lecturas parciales cada 24 horas. Cuando el medio adquiere una intensa coloración roja se considerará formación de ácido, en cambio si la coloración es violeta se debe a la formación de aldehído fórmico.

Es necesario tener presente que el medio de Stern se altera con facilidad por lo que se aconseja conservarlo en heladera al abrigo de la luz. Con todo en estas condiciones es necesario renovarlo cada 30-40 días debido a que toma coloración rojiza que aumenta en intensidad a medida que pasa el tiempo. Deberán siempre realizarse controles sin sembrar.

Composición del medio.

A 100 ml de caldo fermentado se le agregan 5 o 6 gotas de sol. saturada a 37°C. de fucsina básica, 2 cm³ de solución acuosa recientemente preparada de sulfito de sodio al 20 % y 0,5 a 1 cm³ de solución de crisoidina al 0,25 %. Finalmente se agrega 1 g de glicerina pura.

Producción de acetil-metil-carbinol.

El acetil-metil-carbinol fué investigado sobre cultivos en agua-peptonada-glucosa-fosfato de 48 horas de incubación a 37°C. de acuerdo con las recomendaciones de Levine, Epstein y Vaughn (24) quienes trabajando con bacterias del grupo *coli-aerógenes* encuentran el mayor número de reacciones positivas en dicho período de incubación. La técnica preferida ha sido la de Barrit (25) que consiste en agregar a 1 ml de cultivo 1 ml de sol. alcohólica de alfa naftol al 6 %. Agitar bien y agregar 1 ml de sol. de KOH al 16 %. Se vuelve agitar. Si entre los primeros 5-10 minutos aparece un color fresa este indica la presencia de acetil-metil-carbinol.

Medio peplona-glucosa-fosfato.

Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄).....	5	g
Peptona	5	g
Agua destilada	1000	ml

Ajustar la reacción a pH 7,5. Agregar 5 gramos de glucosa. Distribuir en tubos y esterilizar a 115°C. durante 10 minutos. Conviene llevar los

tubos en el autoclave en recipiente de fondo sólido para evitar la coloración amarilla intensa que toma el medio.

Acción sobre medios con ácidos orgánicos.

Esta investigación fué solamente realizada en medio conteniendo d-tartrato debido a que no nos fué posible hallar en el comercio los restantes ácidos orgánicos recomendados. Las pruebas se realizaron sobre cultivos de 10 días de incubación a 37°C. siguiendo un procedimiento bastante similar al que recomiendan Challinor y Rhodes (26). Consiste en agregar a 3 ml de medio, 0,2 a 0,3 ml de sol. acuosa saturada de acetato neutro de plomo, se agita bien y el tubo se deja en posición vertical durante 24 horas a temperatura ambiente y recién entonces se procede a la lectura. Se considera que el ácido orgánico ha sido atacado si en el fondo del tubo aparece un pequeño precipitado granular de carbonato de plomo, quedando límpido el sobrenadante. Si la bacteria en cambio no ataca el ácido se origina un precipitado abundante coposo y blanquecino de tartrato de plomo, el sobrenadante es escaso.

Es aconsejable proceder al agregado de la sol. de acetato neutro de plomo a un tubo conteniendo el medio sin sembrar, control que ayuda bastante a interpretar con corrección las reacciones.

Por razones de economía hemos decidido considerar los resultados a los 10 días sin realizar lecturas parciales al 2° y 5° día.

Composición del medio.

Bacto peptona.....	1	g
NaOH N/10	0,7	ml
Sol. azul bromotimol	1,2	ml
Agua destilada	100	ml

Esterilizar a 110°C. durante 15 minutos. Agregar el ácido orgánico al 1%. Agregar Na. OH N/5 hasta pH 7,4. Calentar 10 minutos en autoclave abierto.

Fórmula de la sol. de azul de bromotimol.

Azul de bromotimol «Merck» ..	1	g
NaOH N/10	25	ml
Agua destilada	475	ml

Reacción del rojo de metilo (R.M.).

Clark y Lubs (27, 28 y 29) basados en trabajos previos de Harden (30) y Harden y Walpole (31) utilizaron indicadores de pH para poder deter-

minar con bastante precisión las modificaciones que sufre la reacción del medio de acuerdo a la concentración de hidrogeniones e introdujeron el rojo de metilo para realizar dicha investigación en componentes del grupo *coli-aerógenes*; dichos investigadores demostraron que las bacterias que como *B. coli* producen una relación gaseosa baja $\frac{\text{CO}_2}{\text{H}_2} = 1$ son rojo de metilo positivas en cambio si producen una relación gaseosa alta, la reacción es negativa.

Para poner en evidencia el fenómeno hemos procedido de la siguiente manera: A un cultivo en agua peptona-glucosa-fosfato de 72 horas de incubación a 37°C. se le agregan 3 o 4 gotas de una solución hidroalcohólica de indicador rojo de metilo al 0,02 %. Se agita y entonces de acuerdo al color que toma el líquido se interpreta. Se considera R.M. positivo (+) cuando el color es rojo, $\text{pH} < 5,5$, subpositivo (+) cuando el color es anaranjado en este caso conviene repetir la prueba) y finalmente reacción negativa (—) si el medio se presenta amarillo ($\text{pH} > 6,0$).

Es interesante hacer notar que la coloración marcadamente amarillenta que a veces presenta el medio de cultivo influye en la tonalidad que presenta el medio luego de agregado el indicador, de ahí que aconsejamos en la preparación de este medio, adoptar la precaución de esterilizarlo en continentes sólidos con lo que se evita que adquiera coloraciones amarillas marcadas.

Medio sintético citratado.

De acuerdo con las indicaciones de Koser y colaboradores ⁽³²⁾ y ⁽³³⁾ que estudiaron con detenimiento el metabolismo de las bacterias del grupo *coli-aerógenes* hemos ensayado el desarrollo bacteriano con el fin de comprobar la utilización del ácido cítrico como única fuente de carbono. Con tal fin hemos utilizado el medio de Koser en el que, como es sabido, *E. coli* es incapaz de desarrollar haciéndolo en cambio *A. aerógenes*.

Siguiendo las indicaciones de Koser hemos incubado durante 5 días a 37°C. y las siembras se efectuaron con alambre recto de platino tratando de no incorporar sustancias nutritivas extrañas que podrían entorpecer los resultados finales.

El medio de Koser es un medio de aspecto cristalino cuando en el no se han desarrollado y multiplicado microorganismos, cuando esto ocurre aparece opalescente y entonces se considera la prueba de Koser positiva (+).

Composición del medio.

Cloruro de sodio puro.....	5	g
Sulfato de magnesio	0,2	g
Fosfato monoamónico	1	g
Fosfato dipotásico	1	g
Agua destilada	1000	ml

Una vez disueltos estos ingredientes se agregan 2 gramos de ácido cítrico. Se ajusta la reacción a pH 6,8 empleando sol. NaOH/N. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 120°C. durante 10 minutos.

Gelatina.

Los primeros ensayos con el fin de observar la licuación de la gelatina fueron realizados a 20°C. pero luego consideramos poco práctica esta técnica pues era necesario emplear un tiempo considerable. Resolvimos sacrificar la observación del tipo de licuación en beneficio de resultados más rápidos y por este motivo la acción proteolítica fué investigada incubando a 37°C. Las lecturas se realizaron cada 10 días y las pruebas se siguieron durante 40 días. Para realizar las lecturas se llevaban los tubos entre 2°C. y 5°C. y se dejaban hasta que el control se presentaba sólido, los tubos que contenían gelatina licuada por acción microbiana no sufrían cambio al estado solido primitivo. Los tubos en todos los casos se cerraron con una pequeña rodaja de corcho para impedir la rápida desecación del medio.

Composición del medio.

Extracto de carne	3	g
Peptona.....	5	g
Gelatina	140	g
Agua destilada	1000	ml
		pH 7,2

Leche tornasolada.

Hemos utilizado leche descremada (centrifugación y sifonaje) a la que se le agrega tintura de tornasol hasta coloración azulada. Luego se distribuye en tubos y se esteriliza por tyndalización.

Caldo Mac Conkey.

En este medio hemos observado la producción de ácido y de gas incubando a 37°C. y a 44°C. La prueba de 44°C. fué realizada en un baño

«ad hoc» cuyas oscilaciones térmicas son de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. lo que asegura la regularidad de la temperatura hecho importante para esta determinación. Para mayores detalles acerca de esta prueba recomendamos al lector interesado los trabajos de Ferramola, R. y Monteverde, J. J. (35-36).

Composición del medio.

Taurocolato de sodio comercial	5 g
Lactosa	10 g
Peptona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Se calienta dos horas en esterilizador de Arnold y luego se lleva durante la noche a $2^{\circ} - 3^{\circ}\text{C}$. Se filtra por la mañana por papel de filtro. Se ajusta la reacción a pH 7,4. Se agregan 10 ml de sol. acuosa de rojo neutro al 1 %. Se distribuye en tubos provistos de campana Durham de fermentación y se esteriliza a 115°C . durante 15 minutos. El medio deberá ser claro de color rojo vinoso sin presentar coloraciones amarillas o anaranjadas.

Serología completa.

Para realizar la serología completa deben considerarse los antígenos flagelares «H» y somáticos «O», la variación de fase en los antígenos «H», la variación V-W. y S-R. Además las variaciones inducidas artificialmente y finalmente la variación mucoide. Aconsejamos al lector que se interese en esta parte consultar el trabajo de Hormaeche E. y Peluffo C. A. (XX) en donde estos especialistas tratan esta importante cuestión.

En el presente trabajo toda cepa que en las pruebas serológicas preliminares reaccionaba positivamente frente a algunos de los sueros polivalentes, eran sometida a serología completa frente a sueros conteniendo factores somáticos y flagelares purificados por adecuadas saturaciones. La prueba macroscópica rápida de aglutinación era por lo general utilizada. Los resultados que requerían confirmación se efectuaban por el método lento. Hemos incorporado como se notará en el detalle que sigue, algunos sueros conteniendo factores que por primera vez mencio-

(xx). — «Las Salmonelosis humanas». Investigaciones realizadas en la Sección Bacteriología del Instituto de Higiene. Montevideo. Año 1942.

namos, tales como el somático XXXIV de *S. illinois* y los flagelares Z²⁸ de *S. javiana*, Z²⁹ de *S. tennessee*, Z²⁷ de *S. simsbury*, etc.

Preparación de los sueros somáticos: Para preparar sueros somáticos hemos inoculado el antígeno por vía intravenosa a conejos de cerca de 2 kilos de peso. Las inyecciones se hacían día por medio comenzando con $\frac{1}{4}$ de cm³ y siguiendo así: $\frac{3}{4}$ cm³; 1 $\frac{1}{2}$, 2 $\frac{1}{2}$ y 4 cm³ por lo general nunca efectuamos más de 5 inoculaciones pues nuestra experiencia nos indica que después de la 5ª inoculación salvo contadas excepciones se obtienen aumentos en la valoración de indiscutibles ventajas prácticas. Hemos realizado hasta 7 inoculaciones en aquellos casos en que obtuvimos sueros de muy baja valoración (repetición) pero como bien lo sabe todo técnico en serología el aumento de título depende no sólo de un antígeno bien preparado y suministrado convenientemente sino del factor conejo. Por nuestra parte poseemos abundante experiencia al respecto debido a que para evitar toda contingencia adversa durante el proceso de inmunización, inoculamos de idéntica manera con el mismo antígeno dos conejos. Observamos con mucha frecuencia que una vez realizada la serie de inoculaciones al sangrar los animales 10 días después obtenemos diferencias sensibles en la valoración así por ej.: 1:320 para un conejo y 1:2560 el otro.

En algunos casos, que citamos más adelante, cuando el antígeno utilizado mataba los animales nos hemos visto forzados a modificar la técnica comenzando entonces por la vía subcutánea para luego inocular por vía venosa pequeñas cantidades hasta llegar a obtener títulos aceptables.

Preparación del antígeno: Para preparar los antígenos somáticos utilizamos cultivo en agar nutritivo de 24 horas de incubación a 37°C.

Para obtener este cultivo se procede a un aislamiento previo en agar lactosa tornasol (24 h-37°C.) eligiendo luego 10 colonias. Se siembra cada una en agar inclinado y se incuban durante 24 h. a 37°C. De cada cultivo se hace una suspensión densa en suero fisiológico (40.000 a 70.000 millones x c.c.) realizando una prueba frente a la tripaflavina 1/500 en agua destilada. (La prueba de la tripaflavina, en muchas oportunidades depara sorpresas, y no todos los investigadores están de acuerdo en utilizarla, con todo por el momento creemos que presta gran ayuda).

Exigimos que sobre las 10 colonias probadas sólo 1 puede presentarse en variación «R» si esto no ocurre se repiten las selecciones hasta obtener esta proporción. En posesión de cultivos «S» (tripaflavina negativos) se lava el desarrollo obtenido sobre el agar con suero fisiológico y la suspensión así obtenida se calienta en Baño María hasta ebullición durante 2 horas. Una vez cumplido este tiempo es necesario dosificar el material

a inocular recurriendo entonces a patrones nefelométricos (Standard de Mac Farland). El antígeno inoculado presentaba la opalescencia del tubo N° 1 del nefelómetro.

Preparación de sueros flagelares: Se cumplen los requisitos anteriores con la diferencia de que la cepa a inocular presente bien desarrolladas sus cilias, en esta oportunidad el antígeno no se calienta pues se destruiría la parte flagelar, sino que una vez hecha la suspensión se formula al 0,3 %. Tanto estos antígenos como los somáticos deben conservarse en la cámara fría al abrigo de la luz. Como norma aconsejamos renovarlos cada 2 a 3 meses.

Los sueros somáticos utilizados, han sido: I; II; III/XIX; IV; V; VI/XIV/XXIV; VI¹; VI²; VII; VIII; IX; IX/XII; X; XI; XIII/XXII; XIV⁴XXV; XVI; XVII; XVIII; XIX; XX; XXI; XXI/XXVI; XXII; XXIII; XXV; XXVII; XXVIII; XXIX; XXX; XXXI; XXXII; XXXIII.B; XXXIV; Vi; AB; C; D.

Sueros flagelares: eh; lw; gms; fgt; gst; mt; en; g m; c,r,e,n,x; y; g.p.u. gp; i; a; g.o.q; gq; fg; u; b; x; f; m; h; p; q; w; s; v; 1.2.3...; 1.5...; 1.6...; 1.7...; 2,5,6,7, Z...; Z⁶; Z¹⁰; Z¹²; Z¹⁴; nZ¹⁵; Z¹⁶; Z¹⁷; Z¹⁸; Z¹⁹; Z²⁰; Z²¹; Z²²; Z²⁷; Z²⁸; Z²⁹; Z⁴Z²⁴X²; Z²⁴X²; Z²³; Z²⁵; Z²³; Z²⁶; Z²⁵; Z²⁶X¹; X² y X³.

Omitiremos, por creerlo innecesario, la preparación de cada uno de estos sueros, será suficiente aportar como ejemplo un protocolo para comprender el mecanismo: *Suero Z²³.Z²⁶*: cepa inoculada P³ (Rubin 14) de fórmula abreviada XXXIII.B.Z⁴.Z²³.Z²⁶. Obtenido el suero la absorción de las aglutinas se cumple con la cepa P⁴ (M 74) de fórmula XXXIII.B.Z⁴.Z²⁴.X³.

Absorción: Para cumplir la absorción utilizamos desarrollo masivo de la cepa correspondiente en agar nutritivo contenido en recipientes de superficie amplia (30 x 30 cm), el desarrollo obtenido se retira con una espátula y en proporciones adecuadas se mezcla con el suero a saturar. Se mezcla bien, se lleva 2 horas a 37°C. y luego hasta el otro día a 2° - 5°C. Se centrifuga hasta que el líquido sobrenadante se presente límpido (suero) se separa por decantación del sedimento (bacterias) y se realizan los controles de saturación titulando el suero frente a la cepa saturante por método lento, a objeto de ver si se ha cumplido o no la absorción.

Con el fin de que el lector posea una idea exacta del panorama serológico que hemos considerado publicamos a continuación el último esquema serológico de Kauffmann-White al que le hemos agregado algunas salmonelas que no se conocían hasta hace poco tiempo. En páginas anteriores se encuentra el esquema serológico propuesto por Peluffo, Edwards y Bruner (5).

Esquema de Kauffmann-White.

T I P O	«O» Antígenos	«H» Antígenos	
		Fase 1	Fase 2
	GRUPO «A»		
1 S. paratyphi A	I. II. XII	a	—
	GRUPO «B»		
2 S. paratyphi B	I. IV. V. XII	b	1. 2. .
3 S. abony	I. IV. V. XII	b	enz ¹⁶
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. 3. .
7 S. chester	IV. V. XII	eh	enz ¹⁷
8 S. saint paul	I. IV. V. XII	eh	1. 2. 3. .
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 ¹⁵ z ¹⁷
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	gom	—
17 S. budapest	I. IV. XII	gt. . .	—
18 S. brandenburg	IV. XII	lv	enz ¹⁵ z ¹⁷
19 S. bispebjerg	I. IV. XII	a	enz ¹⁶
20 S. abortus equi	IV. XII	—	enz ¹⁶
21 S. abortus ovis	IV. XII	c	1. 6. .
22 S. abortus bovis	I. IV. XII. XXVII	b	enz ¹⁶
23 S. bredeney 1	I. IV. XII. XXVII	lv	1. 7. . .
24 S. bredeney 2	I. IV	lv	1. 7. . .
25 S. schleisshein	IV. XII. XXVII	bz ¹²	—
26 S. california	IV. XII	gmt	—
27 S. altendorf	IV. XII	c	1. 7. .
	GRUPO «C»		
28 S. paratyphi C	VI ¹ . VI ² . VII(Vi)	c	1. 5. .
29 S. cholerae suis 1	VI ¹ . VII	c	1. 5. .
30 S. cholerae suis 2	VI ² . VII	c	1. 5. .
31 S. typhi suis	VI ¹ . VI ² . VII	c	1. 5. .

T I P O	«0» Antígenos	«H» Antígenos	
		Fase 1	Fase 2
32 S. thompson	VI ¹ . VI ² . VII	k	1.5..
33 S. virchow	VI ¹ . VI ² . VII	r	1.2..
34 S. oraniemburg	VI ¹ . VI ² . VII	mt	—
35 S. potsdam	VI ¹ . VI ² . VII	lv	enz ¹⁵ z ¹⁷
36 S. bareilly	VI ¹ . VI ² . VII	y	1.5..
37 S. hartford	VI ¹ . VI ² . VII	y	enx..
38 S. mikawasina	VI ¹ . VI ² . VII	y	enz ¹⁵ z ¹⁷
39 S. montevideo 1	VI ¹ . VI ² . VII	gms..	—
40 S. montevideo 2	VI ¹ . VII	gms..	—
41 S. oslo	VI ¹ . VI ² . VII...	a	enxz ¹⁶

Esquema de Kauffmann y White

Esquema antigénico para el diagnóstico

42 S. amersfoort	VI ¹ . VI ² . VII...	d	enxz ¹⁶
43 S. braenderup	VI ¹ . VI ² . VII...	eh	enz ¹⁵ z ¹⁷
44 S. tennessee (x)	VI. VII	z ²⁹	—
45 S. newport	VI ¹ . VIII...	eh	1.2.3...
46 S. kottbus	VI ² . VIII...	eh	1.5...
47 S. bovis morbificans	VI ¹ . VIII...	r	1.5..
48 S. oregon	VI ² . VIII...	d	1.2.3...
49 S. muenchen	VI ² . VIII...	d	1.2..
50 S. manhattan	VI ¹ . VIII...	d	1.5..
51 S. marashino	VI ¹ . VIII...	a	enxz ¹⁶
52 S. glostrup	VI ¹ . VIII...	z ¹⁰	enz ¹⁵ z ¹⁶
53 S. litchfield	VI ¹ . VIII...	lv	1.2.3..
54 S. düsseldorf	VI ¹ . VIII...	z ⁴ . z ²⁴ ...	—
55 S. bonariensis (x)	VI ¹ . VIII...	i	enxz ¹⁷ z ¹⁹
56 S. amherstiana (x)	(VIII)	1(v)	1.6..

GRUPO «D»

57 S. typhi	IX. XII(Vi)	d	—
58 S. enteritidis	I. IX. XII..	gom..	—
59 S. dublin	I. IX. XII...	gp	—
60 S. rostock	I. IX. XII...	gpu	—
61 S. moscow	IX. XII...	gq...	—
62 S. blegdam	IX. XII...	gmq	—
63 S. berta	IX. XII...	fgt	—

T I P O	«0» Antígenos	«H» Antígenos	
		Fase 1	Fase 2
64 S. eastbourne	I. IX. XII...	eh	1.5...
65 S. sendai	I. IX. XII...	a	1.5...
66 S. durban (x)	IX	a	enz ¹⁵ z ¹⁷
67 S. oranimon	I. IX. XII...	b	1.2...
68 S. dar-es-salaam	I. IX. XII...	lw	enz ¹⁶ z ¹⁸
69 S. goettingen	IX. XII...	lw	enz ¹⁵ z ¹⁷
70 S. panamá	I. IX. XII...	lv	1.5...
71 S. javiana (x)	I. IX. XII...	l(z ²⁸)	1.5...
72 S. gallinarum	IX. XII	—	—
GRUPO «E»			
73 S. london	III. X. XXVI	lv	1.6...
74 S. give	III. X. XXVI	lv	1.7...
75 S. anatum	III. X. XXVI	eh	1.6...
76 S. muenster	III. X. XXVI	eh	1.5...
77 S. nyborg	III. X. XXVI	eh	1.7...
78 S. amager	III. X. XXVI	y	1.2.3...
79 S. zanzíbar	III. X. XXVI	k	1.5...
80 S. shangani	III. X. XXVI	d	1.5...
81 S. weltewreden (x)	III. X. XXVI	r	z ⁶
82 S. lexington	III. X. XXVI	z ¹⁰	1.5...
83 S. uganda	III. X. XXVI	lz ¹³	1.5...
84 S. vejle	III. X. XXVI	eh	1.2.3...
85 S. meleagridis	III. X.	eh	lw
86 S. newington	III. XV	eh	1.6...
87 S. selandia	III. XV	eh	1.7...
88 S. new-brunswick	III. XV	lv	1.7...
89 S. illinois	(III). (XV). XXXIV	z ¹⁰	1.5...
90 S. senftenberg	I. III. XIX	gst...	—
91 S. niloese	I. III. XIX	d	z ⁶
92 S. sinsbury (x)	I. III. XIX	z ²⁷	—

OTROS GRUPOS

93 S. aberdeen	XI	i	1.2.3...
94 S. rubislaw	XI	r	enx...
95 S. pretoria (x)	XI	k	1.2.3...
96 S. habana	I. XIII. XXIII	fg...	—

T I P O	«0» Antígenos	«H» Antígenos	
		Fase 1	Fase 2
97 S. worthington	I. XIII. XXIII	lw	z...
98 S. wichita	I. XIII. XXIII	d...	—
99 S. missisipi (x)	I. XIII. XXIII	d	1.7.2.
100 S. poona	XIII. XXII	z...	1.6.2.
101 S. borbeck	XIII. XXII	lv	1.6.2.
102 S. grumpensis (x)	XIII. XXII	d	1.7.2.
103 S. carrau	VI. XIV. XXIV	y	1.7.2.
104 S. ondesteepoort	I. VI. XIV. XXV	e(h)	1.5.2.
105 S. florida (x)	I. VI. XIV. XXV	d	1.7.2.
106 S. hvittingfoss	XVI	b	enz ^z ¹⁶
107 S. gaminara	XVI	d	1.7.2.
108 S. kirkee	XVII	b	1.2.2.
109 S. cerro	XVIII	z ⁴ . z ²³ . z ²⁵	—
110 S. kentucky	(VIII). XX	i	z ⁶ ..
111 S. minnesota	XXI. XXIV	b	enz ^z ¹⁶ ..
112 S. tel aviv	XXVIII	y	enz ^z ¹⁵ ...
113 S. ballerup	XXIX. (Vi)	z ¹⁴	—
114 S. urbana	XXX	b	enz...
GRUPO COLIFORME			
115 S. coli 1	XXXI. (Vi)	—	1.5.2.
116 S. coli 2	XXXII	—	1.5.2.
117 S. arizona	XXXIII. ...	z ⁴ . z ²³ . z ²⁶	—
118 S. coli 3	IV. V. XII. .	—	z ²⁰ (o)
119 S. coli 4	IV. XII. XXVII	—	z ²¹ (o)
120 S. coli 5	I. VI. XIV. XXV	—	z ²² (o)

(x) Significa tipos que hemos agregado.

Significa que puede faltar.

() Significa sólo una parte.

... Especialmente abreviada.

(o) Insuficientemente estudiada.

RESULTADOS OBTENIDOS

Aunque el presente trabajo es esencialmente serológico, no ha sido posible evitar el considerar, aunque en forma somera algunas propiedades bioquímicas y entre ellas preferentemente la fermentación de lactosa. En los cuadros que siguen expresaremos para el conjunto aquellas pro-

propiedades bioquímicas de las cepas sobre las que ha recaído el estudio serológico y que se tratarán «in extenso» más adelante.

Hemos considerado a los efectos de la ordenación expresar nuestros resultados de acuerdo al guión siguiente: 1°) Pruebas bioquímicas preliminares; 2°) Pruebas bioquímicas principales; 3°) Fermentación de lactosa; 4°) Pruebas serológicas preliminares; 5°) Pruebas serológicas completas y relaciones con el género *Salmonella*; 6°) Análisis antigénico; 7°) Pruebas bioquímicas completas de las bacterias sometidas al análisis antigénico.

Pruebas bioquímicas preliminares

Todas las cepas fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas preliminares: fermentación de glucosa, manita, lactosa, sacarosa, producción de indol e hidrógeno sulfurado durante 15 días consecutivos de incubación a 37°C. con lecturas parciales cada 24 horas. Del conjunto de estos «fermentadores lentos de lactosa» es posible realizar agrupaciones provisionarias cuyo comportamiento en líneas generales es el que se expresa en el cuadro que sigue:

CUADRO N° 4

	Glucosa	Manita	Lactosa	Sacarosa	Indol	SH ²
Grupo I	+	+	(+)	—	—	+
» II	+	+	(+)	(+)	—	+
» III	+	+	(+)	—	—	—
» IV	+	+	(+)	(+)	—	—
» V	+	+	(+)	+	+	+
» VI	+	+	(+)	—	+	+
» VII	+	—	(+)	—	+	—
» VIII	+	—	(+)	(+)	+	—
» IX	+	—	(+)	—	—	+
» X	+	—	(+)	(+)	—	+
» XI	+	—	(+)	—	+	+

(+) Significa fermentación lenta y tardía.

Existen cepas cuyo comportamiento preliminar no coincide con ninguna de las combinaciones expresadas en el Cuadro 4, pero de acuerdo con nuestros resultados son excepciones, por esta razón las hemos omitido deliberadamente. El objeto del cuadro precedente es dar al lector una idea aproximada del comportamiento preliminar más frecuente. Además es posible vislumbrar la probable magnitud del problema sobre todo si se tiene en cuenta que en el presente estudio sólo nos hemos detenido con preferencia en aquellas cepas cuyas características coinciden con los grupos I y II. La razón principal es que poseen propiedades muy

similares a las bacterias que pertenecen al género *Salmonella*. En ciertas oportunidades, ya nos extenderemos en las consideraciones finales, recién después del 8° día es posible apreciar el comienzo de fermentación de lactosa o de sacarosa es decir que *en el tiempo que media entre la iniciación del ensayo y la aparición de la fermentación de lactosa, la confusión con patógenos intestinales, es fácil.*

Hemos elegido para nuestro estudio serológico de entre el conjunto de los fermentadores lentos primitivamente aislados cuyo número asciende a 176, solamente aquellos involucrados en los grupos I y II cuyo número asciende a 114; a su vez de estos hemos seleccionado aquellos que presentan antígenos de salmonelas o antígenos ya mencionados por Peluffo, Edwards y Bruner, quedando en definitiva 54.

Pruebas bioquímicas principales.

Los fermentadores lentos de los grupos I y II fueron sometidos posteriormente a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de dulcita, ramnosa, trehalosa y xilosa (la fermentación de lactosa se considerará más adelante en particular); producción de acetil-metil-carbinol (V.P.); reacción del Rojo de Metilo (RM); licuación de gelatina; leche tornasolada; acción sobre el d-tartrato; desarrollo en medio sintético citratado de Koser; prueba de Eijkmann modificada por Wilson (incubación a 44°C. en caldo Mac Conkey); desarrollo en caldo Mac Conkey a 37°C.

Fermentación de dulcita: Las cepas ensayadas pueden dividirse en dos grupos: a) fermentan dulcita con producción de ácido y gas y b) no atacan dulcita.

La fermentación se cumple en la gran mayoría de los casos rápidamente pudiéndose ya a las 24 horas de incubación a 37°C. apreciar abundante gas y viraje neto del indicador hacia la acidez. En contadas ocasiones hemos encontrado cepas que comenzaban formando ácido solamente entre el 2° y 3er. día de incubación para recién formar gas entre el 4° o 5° día.

Ramnosa, trehalosa y xilosa: Estos azúcares fueron fermentados con regularidad entre el 1° y 2° día de incubación con formación de ácido y gas.

Producción de acetil-metil-carbinol. (V.P.).

Ninguna de las cepas ensayadas produjo *acetil-metil-carbinol* en medio agua peptonada-glucosa-fosfato investigado por la técnica de Barritt al alfa-naftol que es, en el momento actual, seguramente la más sensible.

Reacción del rojo de metilo. (R.M.)

La reacción del rojo de metilo fué en todos los casos positiva. Algunas reacciones se presentaron anaranjadas (+) pero en las repeticiones se hicieron positivas. Es interesante mencionar la estrecha correlación negativa que existe entre el R.M. y V.P. ya que en todos los casos es: R.M. + : V.P. —.

Gelatina.

La licuación de la gelatina fué observada durante 30 días, pero deseamos aclarar que si bien a veces se produce la tardía licuación de la gelatina el prolongar tanto tiempo la prueba resta valor práctico a la misma.

En los casos estudiados cuando el microorganismo posee enzimas proteolíticas, la licuación comienza alrededor del 7° día, puede observarse también recién al 10° día, al 20° día y aún cerca del 30° día, después de este tiempo no hemos insistido por lo que los resultados negativos que aportamos se refieren a estas condiciones experimentales (Se gana mucho tiempo reemplazando 25° — 30° por 37°C. y cámara fría).

En las condiciones expresadas los resultados han sido negativos en su gran mayoría salvo el caso de M 17 que licúa después de 10 días y C 9 en 7 días.

Leche tornasolada.

En leche tornasolada los resultados obtenidos están en parte bastante relacionados con la fermentación de lactosa, es decir que cuanto más tardía es ésta tanto más tiempo emplea el microorganismo en virar al rojo el tornasol y coagular la leche. Por lo general la decoloración comienza al rededor del 5° al 8° día y la coagulación entre el 6° y 10° día. Todas las cepas estudiadas acidifican y coagulan lentamente la leche tornasolada.

Acción sobre ácido d-tartárico.

En su gran mayoría fué posible comprobar fermentación del ácido orgánico citado hasta el 10° día de incubación a 37°C., casos negativos se han registrado en un 10 %.

Desarrollo en medio de Koser.

En medio de Koser que posee como única fuente de carbono el ácido cítrico todas las cepas estudiadas lo enturbian por lo general entre las primeras 24 a 72 horas de incubación a 37°C. El desarrollo por lo general

es bastante vigoroso semejándose al que se obtiene con integrantes del género *Aerobacter*. Como se recordará en el medio de Koser no crece la especie tipo del género *Escherichia*.

Desarrollo en caldo Mac Conkey.

En este medio hemos podido comprobar, en un número crecido de cepas, acidez inicial entre las 72 y 96 horas de incubación a 37°C. Debido al color original del medio la reacción del mismo se determinaba en forma aproximativa utilizando al indicador universal de Yamada en piedra de toque. En muchos casos es posible apreciar marcada fluorescencia sobre todo en aquellos casos en que no pudimos comprobar acidez, en otros casos luego de la acidez inicial el medio presenta aspecto fluorescente.

En todos los casos se observa desarrollo y es muy frecuente apreciar una pequeña burbuja de gas alojada en la campana Durham, que aparece entre las 24 y 72 horas.

Incubación a 44°C.

El comportamiento a 44°C, ha sido en líneas generales similar al obtenido en la incubación a 37°C. en caldo Mac Conkey. Creemos necesario, sobre todo desde el punto de vista higiénico, insistir sobre esta prueba pues es bien sabido que se la utiliza para diferenciar *E.coli* de *Aerobacter aerógenes* teniendo en cuenta la propiedad del primero en producir ácido y gas a esta temperatura. Evidentemente el aspecto de los cultivos, para el ojo entrenado presenta algunas diferencias, pero en algunos casos resulta difícil dictaminar con seguridad. Entre muchos de nuestros ensayos tenemos cepas bien conocidas como P⁶, que produce ácido (pH alrededor de 5) y una pequeña burbuja de gas luego de 24 horas de incubación. Esta cepa no es un fermentador de lactosa de los más lentos (AG³), pero en cambio podemos ofrecer el ejemplo de la cepa P³ que empieza a acidificar recién después del 11° día de incubación a 37°C. y presenta marcada acidez recién en el 22° día; a 44°C. produce ácido (alrededor pH 6) y pequeña burbuja de gas luego de 24 horas de incubación.

En algunos casos no hemos notado desarrollo y multiplicación. Es posible comprobar pequeña burbuja de gas en los tubos, en donde la multiplicación se cumple.

En estas experiencias hemos tenido la precaución de adjuntar controles sembrados con *E.coli* y *A.aerógenes*, además cada tubo sembrado antes de ser depositado en el baño de 44°C. era revisado a objeto de comprobar que dentro de la campana de fermentación no había gas.

Fermentación de lactosa

Hemos insistido en la fermentación de lactosa repitiendo 3 veces nuestros ensayos a objeto de poder apreciar en parte las variaciones que sostienen varios autores que citamos en el texto.

Nuestro primer objeto fué observar si existían marcadas diferencias en utilizar un medio constituido por agar al 0,75 % con agregado de 1 % de lactosa y con azul de bromotimol como indicador de acidez (punción) y por otro lado el medio que empleamos en el estudio de las reacciones de fermentación con campana Durham e indicador de Andrade. Como del estudio realizado sacamos en conclusión que prácticamente no hay ventajas, hemos adoptado el medio líquido.

Simultáneamente hemos realizado, al igual que otros investigadores, pruebas con los tubos cerrados, utilizando con tal fin tapones de corcho cubiertos con parafina.

En las condiciones experimentales adoptadas la gran mayoría de los «Fermentadores lentos» estudiados comienzan a fermentar entre el 5° y 8° día de incubación a 37°C. (tubos sin tapón de corcho), presentándose una coloración rosada en el fondo del tubo que comienza a invadir el líquido alojado en la campana de fermentación y que contrasta claramente con el color que presenta el resto del medio. A medida que transcurre el tiempo se presenta, con bastante frecuencia, el líquido que ocupa la campana de color rojo y el resto del medio un tono más claro y aún incoloro. A veces este aspecto persiste hasta que se abandonan los tubos, en otras oportunidades la acidez invade todo el líquido que toma un aspecto rojizo y finalmente puede ocurrir, que la coloración rojiza disminuya hasta desaparecer.

No se puede establecer una norma en el comienzo de la fermentación, hemos tenido casos de fermentación muy tardía y que luego en las repeticiones han acertado el tiempo de aparición de la fermentación, la inversa también se cumple pero con menos frecuencia.

Del estudio comparativo entre siembras en tubos conteniendo agua peptonada-lactosa-Andrade cerrados con tapón de algodón y aquellos cerrados con tapón de corcho parafinado exteriormente, surgen en muchas oportunidades, ventajas para este último procedimiento que acorta la aparición de la fermentación con las consiguientes ventajas prácticas. A este respecto agregaremos que en algunos casos en los tubos cerrados comienza la fermentación 4 días antes que en tubo común, este hecho sin embargo no ha sido lo más frecuente. Es común obtener ventajas de 1 a 2 días. Resultados parejos se constatan en muchas oportunidades. En contadas circunstancias la fermentación apareció primero en los

tubos comunes. Con todo creemos por ahora, en la conveniencia de ensayar la actividad fermentativa frente a medios lactosados contenidos en tubos cerrados con algodón y en tubos cerrados con tapón de corcho y parafina.

También hemos insistido en la repetición de los subcultivos en medios lactosados con el fin de obtener resultados más rápidos. Los resultados logrados no nos permiten aún extraer conclusiones. Los hechos así lo señalan:

Ejemplo 1:

- Original : Acido en 3 días
- 1er. Subcultivo : Acido débil en 6 días.
- 2do. Subcultivo : Acido y gas en 2 días.

Ejemplo 2:

- Original : Acido en 6 días y poco gas en 7 días.
- 1er. Subcultivo : Acido débil en 14 días.
- 2do. Subcultivo : Acido en 2 días.

Ejemplo 3:

- Original : Acido en 10 días.
- 1er. Subcultivo : Acido en 5 días.
- 2do. Subcultivo : Negativo en 40 días.

Ejemplo 4:

- Original : Acido en 3 días
- 1er. Subcultivo : Poco ácido con abundante gas en 4 días.
- 2do. Subcultivo : Acido y gas en 24 horas.

Ejemplo 5:

- Original : Acido en 7 días.
- 1er. Subcultivo : Acido débil en 9 días.
- 2do. Subcultivo : Acido débil en 14 días.

Podríamos enumerar tantos ejemplos como fermentadores lentos hemos considerado pero por no ser este el objeto principal de nuestro trabajo nos concretamos a señalar unos pocos para dar una idea de la irregularidad que ya mencionaremos. Considerando el conjunto surgen algunas ventajas a favor de los subcultivos, pero deseamos hacer constar que convendría estudiar este punto detenidamente considerando todas las variables que intervienen en el fenómeno con el fin de obtener, si esto es posible, ventajas prácticas.

También hemos efectuado ensayos a temperatura ambiente (22°C-26°C) obteniendo resultados bastante similares a los ya obtenidos, por lo general, en un tiempo mayor.

Pruebas serológicas preliminares

De las 114 cepas estudiadas solamente 54 acusaron reacción positiva aglutinante frente a los sueros polivalentes N° 1, N° 2 y N° 3 en la forma expresada en el cuadro que sigue:

CUADRO N° 5
PRUEBAS SEROLÓGICAS PRELIMINARES

Solamente cepas reaccionantes

Cepa	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Cepa	Suero 1	Suero 2	Suero 3
C 1	—	—	±	C 22	+	+	+
C 9	+	+	—	C 26	+	+	+
C 26	+	+	±	C 28	—	—	+
M 1	—	—	+	C 30	—	—	±
M 9	—	—	+	C 32	—	—	±
M 10	—	—	+	C 34	+	—	±
M 11	—	—	+	C 36	+	—	±
M 17	—	—	+	M 18	—	—	±
C 41	+	—	—	M 19	—	—	+
C 44	+	—	—	M 20	—	—	+
S 1	+	—	—	M 21	—	—	+
R 11 ²	±	±	+	M 22	—	—	+
R 8 ⁵	±	±	+	M 23	—	—	+
R 19 ²	+	—	+	M 24	—	—	+
R 19 ³	+	—	+	M 25	—	—	+
R 19 ⁴	+	±	+	S 2	—	±	—
R 19 ⁵	+	—	+	L 1	—	—	+
R 8 ¹	+	±	±	L 2	—	—	+
R 8 ²	+	±	±	L 3	—	—	±
R 8 ³	—	—	±	L 4	—	—	+
R 8 ⁴	±	±	±	L 5	—	—	+
R 9	+	+	+	L 6	—	—	+
R 16 ^a	+	+	+	L 7	—	±	—
R 16 ^b	+	+	+	LC 4	+	—	—
R 16 ^c	+	+	+	LC 7	+	+	—
				LC 9	+	+	—
				LC 10	—	—	+
				LC 12	+	+	—
				LC 13	+	+	—

Las cepas citadas en el cuadro anterior fueron sometidas a pruebas serológicas completas.

Pruebas serológicas completas.

En el cuadro que sigue solamente señalaremos las reacciones positivas obtenidas frente a todos los sueros aglutinantes anti-salmonela y aquellos preparados con los tipos de Peluffo, Edwards y Bruner, en pruebas macroscópicas rápidas.

CUADRO N° 6

Cepa	Somáticos											Flagelares					
	IV	V	VI XIV XXIV	VII	VIII	IX XII	XIV XXV	X	XXXI	XXXII	XXXIII	AB	C	Z ⁴ Z ²³ Z ²⁶	Z ²⁰	Z ²¹	Z ²²
C 1						+	±						±	+			
C 9			+	+			+		+				+	+			
C 16							+						+	+			
M 1																	
M 9																	
M 10	±				±	±			+	+	+	+	+	+			
M 11																	
M 17																	
C 41			+				+										
C 44			±				+						+				
S 1	±						+										
R 11 ²						+	±					+	+	+			
R 8 ⁵						+	±					+	+	+			
R 19 ²			±			+	±					+	+	+			
R 19 ³			±			+	±					+	+	+			
R 19 ⁴			±			+	±					+	+	+			
R 19 ⁵			±			+	±					+	+	+			
R 8 ¹						+	±					+	+	+			
R 8 ²						+	±					+	+	+			
R 8 ³						+	±					+	+	+			
R 8 ⁴			+			+	±					+	+	+			
R 9						+	±		+			+	+	+			
R 16 ^a	+	+	+	+		+	±		+			+	+	+			
R 16 ^b	+					+	±		+			+	+	+			
C 22			+			+	±		+			+	+	+			
C 26						+	±		+			+	+	+			
C 28						+	±		+			+	+	+			
C 30						+	±		+			+	+	+			
C 32						+	±		+			+	+	+			
C 34			+			+	±		+			+	+	+			
C 36						+	±		+			+	+	+			
M 18						+	±		+			+	+	+			
M 19						+	±		+			+	+	+			
M 20						+	±		+			+	+	+			
M 21						+	±		+			+	+	+			
M 22						+	±		+			+	+	+			
M 23						+	±		+			+	+	+			
M 24						+	±		+			+	+	+			
M 25						+	±		+			+	+	+			
S 2			+			+	±		+			+	+	+			
L 1						+	±		+			+	+	+			
L 2						+	±		+			+	+	+			
L 3						+	±		+			+	+	+			
L 4						+	±		+			+	+	+			
L 5						+	±		+			+	+	+			
L 6						+	±		+			+	+	+		+	+
L 7						+	±		+			+	+	+			
LC 4	+					+	±		+			+	+	+			
LC 7			+	+		+	±		+			+	+	+			
LC 9						+	±		+			+	+	+			
LC 10						+	±		+			+	+	+			
LC 12			+	+		+	±		+			+	+	+			
LC 13			+	+		+	±		+			+	+	+			
R 16 ^c				+		+	±		+			+	+	+			

Todas las pruebas positivas logradas en el método rápido fueron repetidas utilizando el método lento, los resultados obtenidos son los que a continuación se detallan:

Cepa C 22

Suero VI/XIV/XXIV	: < 1:20
Suero IX/XII	: < 1:20
Suero XIV/XXV	: 1:20
Suero XXXI	: < 1:20
Suero «C»	: 1:20
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40

Cepa C 26

Suero XIV/XXV	: 1:1280
Suero «C»	: 1:80
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:160

Cepa C 28

Suero «C»	: 1:20
-----------	--------

Cepa C 30

Suero XXXI	: 1:20
Suero «C»	: 1:40

Cepa C 32

Suero «C»	: 1:40
-----------	--------

Cepa C 34

Suero VI/XIV/XXIV	: < 1:20
Suero XIV/XXV	: 1:20
Suero «C»	: < 1:20

Cepa C 36

Suero IX/XII	: 1:40
Suero «C»	: 1:20

Cepa M 18

Suero XXXII	: 1:80
Suero «C»	: < 1:20

Cepa M 19

Suero XXXII	: 1:160
-------------	---------

Cepa M 20

Suero XXXI	: < 1:20
------------	----------

Cepa M 21

Suero IX/XII	: < 1:20
Suero XXXII	: 1:320

Cepa M 22

Suero XXXII	: 1:640
-------------	---------

Cepa M 23

Suero «C»	: 1:40
-----------	--------

Cepa M 24

Suero XXXI	: 1:40
------------	--------

Cepa M 25

Suero XXXI	: 1:40
Suero «C»	: < 1:20

Cepa S 2

Suero VI/XIV/XXIV	: 1:40
Suero IX/XII	: 1:40

Cepa L 1

Suero «C»	: 1:80
Suero Z ²⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:80

Cepa L 2

Suero «C»	: 1:160
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40

Cepa L 3

Suero «C»	: 1:20
-----------	--------

Cepa L 4

Suero «C»	: 1:80
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:160

Cepa L 5

Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:320
Suero Z ²⁰	: 1:20
Suero Z ²¹	: 1:40
Suero Z ²²	: 1:40

Cepa L 6

Suero «C»	: 1:320
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:320

Cepa L 7

Suero XIV/XXV	: 1:40
Suero «C»	: < 1:20

<i>Cepa L.C. 4</i>	Suero XXXI	: < 1:20
Suero IV	Suero XXXIII	: < 1:20
Suero IX/XII	Suero «C»	: 1:40
Suero XIV/XXV	Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶		: 1:40
<i>Cepa L.C. 7</i>	<i>Cepa C 16</i>	
Suero VI/XIV/XXIV	Suero XIV/XXV	: 1:20
Suero VII	Suero «C»	: 1:20
Suero XIV/XXV	Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:30
<i>Cepa L.C. 9</i>	<i>Cepa M 1</i>	
Suero XIV/XXV	Suero XXXII	: 1:160
<i>Cepa L.C. 10</i>	<i>Cepa M 9</i>	
Suero XXXIII	Suero XXXII	: 1:160
Suero «C»	<i>Cepa M 10</i>	
Suero Z ²⁰	Suero IV	: < 1:20
<i>Cepa L.C. 12</i>	Suero VIII	: < 1:20
Suero VI/XIV/XXIV	Suero XXXI	: < 1:20
Suero VII	Suero XXXII	: < 1:20
Suero IX/XII	Suero XXXIII	: < 1:20
Suero XIV/XXV	Suero AB	: < 1:20
Suero X	Suero C	: 1:40
<i>Cepa L.C. 13</i>	Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:80
Suero VI/XIV/XXV	<i>Cepa M 11</i>	
Suero VII	Suero XXXII	: 1:320
Suero XIV/XXV	<i>Cepa M 17</i>	
<i>Cepa R 16^c</i>	Suero XXXII	: 1:160
Suero VII	<i>Cepa C 41</i>	
Suero XIV/XXV	Suero VI/XIV/XXIV	: 1:20
Suero «C»	Suero XIV/XXV	: 1:40
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	<i>Cepa C 44</i>	
<i>Resultados obtenidos mediante método lento^o</i>	Suero VI/XIV/XXIV	: < 1:20
<i>Cepa C 1</i>	Suero IX/XII	: 1:40
Suero IX/XII	Suero XIV/VXX	: 1:20
Suero XIV/XXV	<i>Cepa S 1</i>	
Suero «C»	Suero IV	: < 1:20
Suero Z ⁴ ,Z ²³ ,Z ²⁶	Suero IX/XII	: 1:40
<i>Cepa C 9</i>	<i>Cepa R 11²</i>	
Suero VI/XIV/XXIV	Suero IX/XII	: 1:160
Suero VII	Suero XXXIII	: < 1:20
Suero XIV/XXV	Suero «C»	: 1:320

<i>Cepa R 8⁵</i>		<i>Cepa R 8⁴</i>	
Suero IX/XII	: 1:40	Suero VI/XIV/XXIV	: < 1:20
Suero XIV/XXV	: < 1:20	Suero XIV/XXV	: 1:20
Suero «C»	: 1:40	Suero «C»	: 1:40
Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:320	Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40
<i>Cepa R 19²</i>		<i>Cepa R 9</i>	
Suero VI/XIV/XXV	: 1:20	Suero IX/XII	: 1:40
Suero IX/XII	: 1:40	Suero XXXI	: < 1:20
Suero XXXIII	: < 1:20	Suero «C»	: 1:20
Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:160	Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:80
<i>Cepas R 19³, R 19⁴ y R 19⁵ igual que la anterior.</i>		<i>Cepa R 16^a</i>	
<i>Cepa R 8¹</i>		Suero IV	: < 1:20
Suero XIV/XXV	: < 1:20	Suero V	: < 1:20
Suero «C»	: 1:40	Suero VI/XIV/XXIV	: 1:20
Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:80	Suero VII	: < 1:20
<i>Cepa R 8²</i>		Suero IX/XII	: 1:20
Suero XIV/XXV	: 1:40	Suero XIV/XXV	: 1:160
Suero «C»	: 1:40	Suero XXXI	: < 1:20
Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40	Suero «C»	: 1:40
<i>Cepa R 8³</i>		Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:160
Suero XIV/XXV	: 1:20	<i>Cepa R 16^b</i>	
Suero «C»	: 1:20	Suero IV	: < 1:20
Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:40	Suero XIV/XXV	: 1:80
		Suero «C»	: 1:40
		Suero Z ¹ ,Z ²³ ,Z ²⁶	: 1:80

Absorción de aglutininas.

Las cepas que presentaron reacción aglutinante frente a los sueros anti-salmonelas fueron sometidas a pruebas de absorción obteniendo los resultados siguientes:

Suero VI/XIV/XXV — Título 1:1280.

Las designadas: R 16^a; C 26; R 16^b y R 16^c son capaces de disminuir el valor del suero pero utilizando gran cantidad de bacterias. Si se hacen absorciones fraccionadas, por lo general la valoración disminuye poco y además nunca se logran absorciones tan completas como cuando se utiliza la sobreabsorción, es decir cuando se incorpora una gran masa bacteriana absorbente.

Las cepas restantes que por lo general son aglutinadas frente el suero mencionado al título 1:20—1:40 son incapaces de disminuir en forma os-

tensible el título original a pesar de someter el suero a 2 absorciones sucesivas.

Suero IV: Título 1:1280, *Suero V*: Título 1:640; *Suero VI—VII*: Título 1:640; *Suero VII*: Título 1:320; *Suero XXXI*: Título 1:640; *Suero XXXII*: Título 1:1280; *Suero AB*: Título 1:1280 y *Suero VIII*: Título 1:640.

Todas las cepas que presentaron reacción positiva en la prueba aglutinante rápida acusaron, posteriormente, títulos bajos por el método lento. Las pruebas de absorción demuestran que 2 absorciones sucesivas no son suficientes para disminuir la valoración inicial del suero correspondiente.

Suero XXXII: Título 1:1280.

Las cepas M 1; M 9; M 11; M 17; M 18; M 19; M 21; y M 22 son aglutinadas por este suero entre 1:80 a 1:640. Más adelante detallamos los resultados del análisis antigénico de estas bacterias por lo que no nos extenderemos aquí.

Suero XIV/XXV: Título 1:1280.

A excepción de las cepas R 16^a; R 16^b; R 16^c y C 26 que en las pruebas de absorción disminuyen el título original, las otras a pesar de ser aglutinadas fuertemente en la prueba rápida, pero a bajo título en la prueba lenta, son incapaces de disminuir la valoración aún después de 2 absorciones sucesivas.

Suero IX/XII: Título 1:1280.

Nos interesaban muy especialmente aquellos «Fermentadores lentos» que reaccionaban positivamente frente a este suero, pero los valores obtenidos en la prueba lenta siempre fueron bajos. Los ensayos de absorción demuestran que las cepas estudiadas, salvo la C 36, son incapaces luego de 2 absorciones sucesivas de disminuir el título original del suero.

Suero «C»: Título 1:640.

Los ensayos realizados con el suero «C» si bien no están directamente ligados a los antígenos somáticos conocidos hasta hoy en las salmonelas, puede presentar en el futuro interés pues ya Peluffo y col. lo han señalado en «Paracolibacilos» que poseen antígenos de salmonela. Es evidente que para aquellos que deseen profundizar el estudio serológico de los «Fermentadores lentos» los resultados obtenidos presentan incuestionable valor. El suero C aglutina muchas de las cepas sometidas a estudio en este trabajo algunas a bajo título como :C 1; C 9; C 16; M 10; R 8⁵; R 8¹; R 8²; R 8³; R 8⁴; R 9; R 16^a; R 16^b; C 22; C 28; C 30; C 32; C 34; C 36; M 18; M 23; M 25; L 3; L 7; LC 10 y R 16^c.

Otras cepas son aglutinadas a títulos entre 1:80 a 1:320 como : R 11; C 26; L 1; L 2; L 4 y L 6 (estas 4 últimas fueron sometidas al análisis antigénico) las pruebas de absorción demuestran que estas cepas en dos absorciones sucesivas disminuyen ostensiblemente el título original del suero.

Suero Z⁴, Z²³, Z²⁶: Título 1:5120.

Este suero en las pruebas rápidas aglutina un elevado número de distintos «fermentadores lentos». En las pruebas lentas en cambio observamos que la casi totalidad de estas aglutinaciones son a bajo título llegando los más altos a cifras 1:320. Las absorciones efectuadas demuestran que estas cepas son incapaces de disminuir la valoración original.

ANÁLISIS ANTIGÉNICO

Para proceder al análisis antigénico hemos elegido aquellas cepas que presentan un título elevado frente a los sueros ensayados.

En primer término adelantaremos los resultados logrados con los «Fermentadores lentos» que sólo reaccionan positivamente frente al suero XXXII. Se trata de las cepas M 1; M 9; M 11; M 19; M 21 y M 22.

El análisis de la estructura somática se cumplió en la forma que sigue:

SUERO XXXII (E 138)

	Antígenos	
	E 138	M 1
Sin saturar	1:1280	1:1280
Saturado E 138	< 1:80	< 1:80
Saturado M 1	160	< 1:80

SUERO M 1

	Antígenos	
	E 138	M 1
Sin saturar	1:1280	1:2560
Saturado E 138	< 1:80	< 1:80
Saturado M1	< 1:80	< 1:80

Antígenos flagelares: Todas las cepas citadas son móviles. El estudio de la constitución antigénica flagelar nos ha permitido preparar con ellas sueros con títulos 1:5120 y 1:10240. Estas cepas no fueron agluti-

nadas en las pruebas rápidas por ninguno de los sueros flagelares que hemos utilizado en este trabajo y que ya hemos mencionado.

La prueba de absorción cruzada entre las cepas: M 1; M 9; M 11; M 19; M 21 y M 22 demuestran que poseen identidad antigénica tanto somática como flagelar.

El análisis precedente nos indica que existe una estrecha relación somática entre E 138 (*S. coli* del esquema de Kauffmann) que posee el factor XXXII y las cepas de «Fermentadores lentos» ensayadas.

Llamamos la atención de que el suero XXXII saturado con M 1 es capaz de aglutinar a *E 138* al título 1:160 lo que indica que *E 138* posee además de XXXII un resto antigénico propio menor. Por el momento, a los efectos de no complicar la notación, hemos decidido no incluir este factor en la espera de mayor información experimental.

Con respecto a la parte flagelar el análisis indica que los «Fermentadores lentos» que consideramos poseen un antígeno aún no mencionado para el que proponemos el símbolo X^4 , consecuentes con la notación que iniciaron oportunamente Peluffo y col., en otras bacterias fermentadoras de lactosa.

Hemos intentado por repetidas selecciones naturales poner en evidencia el fenómeno de variación de fase, sin lograrlo. Finalmente insistimos en la inducción artificial sin modificar tampoco los resultados obtenidos. Por lo tanto, sostenemos para las cepas M 1; M 9; M 11; M 21 y M 22 la fórmula serológica:

XXXII. X^4 .—

Debido a que las cepas L 1; L 2; L 4 y L 6 en las pruebas serológicas preliminares (Positivas frente a suero somático C y flagelar Z^4, Z^{23}, Z^{26} y en las pruebas lentas acusan títulos muy sugestivos y similares, hemos considerado conveniente analizarlas antigénicamente. Los ensayos se dispusieron en la forma que sigue:

Estructura somática

	SUERO C (P 9)	
	Antígenos	
	P 9	L 6
Sin saturar	1:1280	1:320
Saturado P 9	< 1:80	< 1:80
Saturado L 6	1:320	< 1:80

SUERO L 6

	Antígenos	
	P 9	L C
Sin saturar	160	1280
Saturado P 9	< 1:80	640
Saturado L 6	< 1:80	< 1:80

El análisis precedente indica que además de la fracción «C» la cepa L 6 posee un antígeno principal para el que proponemos la letra E.

El análisis de la estructura antigénica flagelar demuestra que L 6 posee un resto antigénico menor común con el suero Z⁴, Z²³, Z²⁶, y con el suero Z⁴, Z²⁴, X². Debido a que es incapaz de disminuir la valoración de estos sueros en las pruebas de absorción repetidas en 2 oportunidades pensamos que se trata de un resto antigénico de poca importancia en el momento actual. El suero preparado con L 6 (móvil) acusa alto título (1:10240), por otra parte ninguno de los sueros «H» utilizados es capaz de aglutinar francamente el citado «Fermentador lento» por lo que sostenemos que posee una fracción antigénica flagelar predominante que aún no ha sido señalada y a la que proponemos el símbolo X⁵.

La investigación de la variación de fase por selección natural o por la inducción artificial no nos ha permitido modificar la estructura antigénica.

Los ensayos de absorción cruzada entre L 6; L1; L 2 y L 4 demuestran que son antigénicamente iguales.

Para estos fermentadores, de acuerdo a los resultados logrados, sugerimos la siguiente fórmula serológica:

E (C). X⁵.—.

Contemplando los resultados logrados en las pruebas aglutinantes se pueden apreciar cepas cuyo análisis antigénico sería muy útil. El hecho de no haberlas incluido en el presente trabajo obedece a que poseen «mosaicos» antigénicos somáticos y flagelares sumamente complejos cuya tarea se prosigue sin poder vaticinar el tiempo a emplear en su estudio completo; o bien por que se han presentado, luego de varios subcultivos, persistentemente en variación «R».

Propiedades bioquímicas completas de las cepas sometidas al análisis antigénico.

En el cuadro que sigue exponemos en conjunto las propiedades bioquímicas de las cepas sometidas al análisis antigénico el cual no necesita mayores comentarios.

CONSIDERACIONES GENERALES

El estudio serológico realizado indica la existencia de relaciones antigénicas entre las bacterias que pertenecen al género *Salmonella* y aquellas que se caracterizan por fermentar tardía o debilmente lactosa y que muchos investigadores denominan «Gérmenes azules», «Paracolibacilos», «Grupo intermediario» (entre paratíficos y colibacilos) etc. Todos estos nombres demuestran que existe confusión ya que no se ha llegado a un acuerdo siquiera en la designación o agrupación de estos microorganismos. Provisoriamente hemos adoptado el término «Paracolibacilos» para referirnos al conjunto y el de «Fermentadores lentos» a una fracción de estos sobre los que ha recaído la presente investigación.

Las relaciones serológicas han sido investigadas por el método aglutinante, demostrando la prueba rápida macroscópica (toques), que ha sido la preferida con fines de orientación, un gran número de reacciones positivas por parte de los «Fermentadores lentos» puestos en contacto con los sueros que hemos mencionado en el texto y que han sido preparados con las salmonelas hasta hoy conocidas, «Salmonelas Coli» de Kaufmann y los tipos de Peluffo, Edwards y Bruner. Sobre el total de 176 «Fermentadores lentos», 54 reaccionaron positivamente frente a uno o varios de los sueros citados (Ver el cuadro N° 5). El estudio serológico recayó sobre estas 54 cepas comenzando por controlar todas las reacciones positivas logradas por el método rápido, utilizando ahora la prueba lenta. Con este último proceder se pudo apreciar que gran parte presentaba relaciones serológicas parciales (títulos somáticos no mayores de 1:40 y flagelares no mayores 1:160) y los restantes aparecían con títulos más expresivos (Somáticos de 1:80 a 1:640 y en 1 caso 1:1280 y flagelares de 1:160 a 1:320). Las pruebas de absorción demostraron para el primer caso que efectivamente se trataba de restos antigénicos menores los cuales seguramente nada tienen que ver con los antígenos que simbolizan los esquemas serológicos considerados.

Respecto a los «Fermentadores lentos» que presentan títulos más sugestivos (somáticos 1:80 a 1:640 o 1:1280) y flagelares de 1:160 a 1:320) es necesario extenderse algo más.

Con respecto a los antígenos somáticos de salmonelas el suero conteniendo los factores de *S. Ondestepoort* (I.VI.XIV.XXV) fué el que acusó los mejores títulos, en un caso 1:1280; el análisis antigénico de las cepas que poseen estas fracciones antigénicas aún no se ha terminado.

Los sueros IV; VII; VIII; IX/XII; X; y XXXIII que aglutinaron positivamente a los «Fermentadores lentos» en el método rápido, lo hicieron a títulos despreciables en la prueba lenta. Respecto a los sueros

CUADRO N° 7. — PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS SO

	Almidón	Arab.	Dext.	Dulc.	Erit.	Galact.	Glucosa	Inosita	Inulina	Isodulc.	Lactosa	Levul.	Maltosa	Manita	Manosa	Rafin.	Sacarosa	Salic.	Sorbita	Trehal.
1	— ¹⁵	AG ¹	(a ¹)	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	a ⁵	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹
9	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁶	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	Ag ¹
11	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁶	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹
19	— ¹⁵	AG ¹	(a ¹)	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁷	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	AG ¹
21	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	a ⁸	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹
22	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁶	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹
1	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	a ⁵	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	AG ¹
2	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	a ⁶	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹
4	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁵	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	Ag ¹	AG ¹
5	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	a ⁶	AG ¹	AG ¹	AG ¹	AG ¹	— ¹⁵	— ¹⁵	— ¹⁵	AG ¹	AG ¹

- ¹⁵ : Significa negativo en 15 días.
(a¹) : Significa escasa acidez en el interior de la campana de fermentación.
Ag¹ : Significa acidez franca y escasa producción de gas en un día.
AG¹ : Significa franca producción de ácido y gas en un día.

PAS SOMETIDAS AL ANALISIS ANTIGENICO

Sorbita	Trehal.	Xilosa	D. tart.	BITTER				SIMMONS					H ² S	L. T.	Stern.	Gelat.	Indol.	Koser	V. P.	R. M.
				Arab.	Dulc.	Gluc.	Ramn.	Arab.	Dulc.	Gluc.	Ramn.	Citr.								
AG ¹	Ag ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ²	+ ¹	Azul ¹ Rojo ⁵ Coag. ¹¹	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
Ag ¹	Ag ¹	Ag ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ³	+ ²	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁶	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
AG ¹	AG ¹	AG ¹	± ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁹	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
Ag ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ³	+ ¹	+ ²	+ ²	+ ¹	Azul ² Rojo ⁶ Coag. ¹⁰	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
AG ¹	AG ¹	AG ¹	± ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ²	+ ¹	Azul ² Rojo ⁴ Coag. ⁵	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
AG ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ³	+ ²	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁵	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
Ag ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+ ¹	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁶	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ²	—	+
AG ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ²	+ ³	+ ²	+ ²	+ ¹	+ ¹	Azul ¹ Rojo ² Coag. ⁵	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
Ag ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ²	+ ³	+ ¹	+ ³	+ ¹	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁶	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+
AG ¹	AG ¹	AG ¹	- ¹⁰	—	—	+	—	+ ¹	+ ³	+ ²	+ ²	+ ¹	+ ¹	Azul ¹ Rojo ³ Coag. ⁸	+ ²	- ³⁰	- ²	+ ¹	—	+

flagelares (Salmonelas) sólo aquellos conteniendo los factores Z^4, Z^{23}, Z^{26} y Z^4, Z^{24} y x^2 acusaron resultados positivos; una gran parte en la prueba rápida y comparativamente pocos en la prueba lenta y nunca al título.

El suero IX/XII originó aglutinaciones francas frente a varios «Fermentadores lentos» algunos de ellos aislados a partir de excrementos e intestino de aves (gallinas). La prueba lenta y la absorción demostraron claramente que se trataba de antígenos residuales. Con todo nos queda la duda de la probable ingerencia de estas fracciones antigénicas sobre las aves debido a que estas cepas se aislaron de animales portadores de *S. pullorum* con reacción aglutinante positiva frente al antígeno pullorum coloreado. Si recordamos que tanto *Salmonella pullorum* como *Salmonella gallinarum* poseen las fracciones antigénicas IX.XII, resultaría de interés inquirir que rol desempeña en el organismo de las aves la fracción de estos «Fermentadores lentos» capaz de reaccionar en las pruebas rápidas frente al suero IX.XII (preparado con *S. gallinarum*).

De los sueros que corresponden a las *S. coli* (Kauffmann), cepas que como es sabido se vinculan a las salmonelas por poseer los antígenos 1.5... , y los somáticos I, IV, V, XII, XIV, XXV, XXVII y Vi, encontramos que el suero somático de *S. coli* 2 (XXXII.-1.5...) aglutina un número nada despreciable de nuestros «Fermentadores lentos». Debido a que estas *S. coli* poseen efectivos vínculos con las salmonelas típicas, aunque su posición sistemática aún no aparece definida, hemos creído interesante realizar el estudio detenido de las cepas que reaccionaron positivamente en el método lento con suero XXXII, en esta forma hemos podido adelantar la fórmula XXXII. x^4 .— para un grupo de «Fermentadores lentos» en donde el factor flagelar x^4 se propone como símbolo nuevo.

Parece tentadora la idea de que las bacterias con soma XXXII pertenecen o están ligadas a un grupo serológico posiblemente extendido y numeroso; tan es así que obran actualmente en nuestro poder varias cepas recientemente aisladas de distintos materiales que en las pruebas preliminares han reaccionado positivamente frente al mencionado suero somático. Refuerza también nuestra suposición una información del Dr. C. A. Peluffo⁽³⁷⁾ quien nos expresa haber hallado cerca de 50 cepas de «Fermentadores lentos» que en las pruebas serológicas preliminares reaccionan positivamente frente al suero XXXII.

Con las cepas L 1, L 2, L 4 y L 6 es posible formar otra agrupación serológica que por la parte somática posee vínculos con el grupo 4 de Peluffo y col.,⁽⁵⁾ (C. Z^4, Z^{23}, Z^{26}) y que presenta una relación antigénica flagelar con los sueros preparados con *S. arizona* y P^5 (36.608) del grupo

3 de Peiuffo y col.; posteriormente se ha visto que esta relación no es importante. El análisis antigénico ha permitido sugerir la fórmula E (C). x^5 .—, indicando que el factor C no es predominante en el «mosaico» somático. Los factores E y x^5 corresponden a símbolos nuevos que proponemos.

○ Con respecto a los «Fermentadores lentos» restantes que demostraron poseer relaciones serológicas importantes con las bacterias del género *Salmonella*, y cuyo análisis antigénico revestía interés, como ya lo hemos expresado anteriormente, nos ha obligado en unos casos a continuar su estudio debido a que la complejidad antigénica así lo requería y en otros a detenernos a causa de que las bacterias originalmente «S» se presentaron de manera persistente en variación «R» siendo esto último lo más frecuente. Debido a este último inconveniente deseamos insistir en la conveniencia de utilizar «Fermentadores lentos» que no hayan sido sometidos a repetidos subcultivos ya que la variación SR se cumple con una frecuencia poco deseable.

○ Si desde el punto de vista teórico resulta importante encadenar serológicamente estas bacterias en donde los «Fermentadores lentos» presentan una posición sistemática incierta, desde el punto de vista práctico los intentos que se realicen para contribuir al mejor conocimiento de ellos tiene forzosamente que presentar el mayor interés para el bacteriólogo y en especial modo a todos aquellos que se dedican o especializan en la flora microbiana del tubo digestivo. Pensamos en esta forma porque durante el curso de nuestras investigaciones sobre salmonelas y shigelas tropezamos en muchas oportunidades con «Fermentadores lentos» que han entorpecido nuestra tarea. En los laboratorios de diagnóstico microbiológico el técnico necesita librar a la brevedad posible, dentro de la seguridad, un resultado con el objeto de que pueda iniciarse una terapéutica adecuada. Desgraciadamente en muchos casos y en este de los «Fermentadores lentos», se suele presentar el dilema, sobre todo cuando se necesitan resultados a la brevedad, de si se está frente a un integrante del género *Salmonella* o a un «Fermentador lento». La situación anterior puede explicarse de la manera siguiente: muchos «Fermentadores lentos» y en particular los que aquí estudiamos presentan propiedades bioquímicas de orientación iguales a las bacterias del género *Salmonella* por lo menos durante los 5 primeros días o dicho de otra manera hasta el momento en que se inicia la fermentación de lactosa, por lo general ante bacterias que a las 24 horas de incubación a 37°C. presentan comportamiento similar a los integrantes del género *Salmonella*, se realizan las pruebas serológicas de orientación. Si las pruebas serológicas preliminares se presentan negativas se continúan observando las pruebas bioquímicas

realizadas y a objeto de ir ganando tiempo se completa el estudio bioquímico agregando las restantes pruebas, pues podría tratarse de algún tipo serológico nuevo.

Si se trata de un «Fermentador lento» la presunción de un posible tipo serológico nuevo comienza a desvanecerse cuando se inicia la lenta fermentación de lactosa.

Si a este serio inconveniente agregamos los «Fermentadores lentos» que reaccionan positivamente en las pruebas rápidas aglutinantes preliminares, la confusión aumenta pues se comienza rápidamente la clasificación serológica completa realizando un inútil gasto de sueros diagnósticos pues es imposible, por lo menos así nos ha ocurrido, ubicar en el esquema serológico de las *Salmonellas* a los «Fermentadores lentos» de lactosa. Ante una bacteria que fermente lactosa lentamente, suponemos en el 8° día y que además sea aglutinada positivamente por los sueros polivalentes antisalmonelas es posible entonces caer en error por las siguientes razones:

a) Porque las propiedades bioquímicas preliminares hasta el 8° día (para el supuesto precedente) son iguales a las que poseen las bacterias del género *Salmonella* (Para los «Fermentadores lentos» que hemos elegido para este estudio).

b) Porque la serología preliminar acusa reacciones positivas, lo que hace sospechar la posesión de antígenos de salmonelas.

Los inconvenientes que trae aparejado este comportamiento podrían resumirse así:

Debido a que después de 24 h de incubación a 37°C. los distintos cultivos realizados a partir de una colonia sospechosa coinciden con los que poseen las bacterias del género *Salmonella* y además las pruebas serológicas preliminares confirman, por ser positivas, esta presunción, se completan las pruebas bioquímicas y se inicia la serología total a objeto de llegar prontamente al diagnóstico exacto de una posible salmonela. Como por las pruebas bioquímicas recién en el 8° día se aprecia la iniciación de la fermentación de lactosa, hecho que posteriormente ha de conducir al diagnóstico exacto; durante este tiempo en el afán de obtener resultados rápidos se han iniciado las pruebas serológicas completas las cuales son lo bastantes confusas como para impedirnos llegar a alguna conclusión.

Cuando aparece la fermentación de lactosa comienza a aclararse el panorama, pero han transcurrido 3 días durante los cuales no se ha podido librar un diagnóstico que por lo general urge, se ha perdido mucho tiempo y además gran cantidad de material y trabajo.

Ante estos hechos y considerando que en el momento actual la fermen-

tación de lactosa es decisiva (existe una variedad de *S. anatum* que fermenta lactosa) realizamos una serie de ensayos con el objeto de obtener el acortamiento del tiempo desde que se siembra un «Fermentador lento» hasta que inicia la fermentación de lactosa. Los resultados obtenidos se comentan en el texto. Consideramos además que es de gran importancia práctica insistir sobre este punto, sobre todo actualmente en que la serología de los «Fermentadores lentos» está en sus comienzos.

En lo que atañe a las propiedades bioquímicas casi todas ellas han sido comentadas en el texto, correspondería agregar que salvo la fermentación de lactosa (ácido) y la acción sobre la leche tornasolada, las restantes son similares a muchos integrantes del género *Salmonella*. Las propiedades morfológicas y tintoriales son iguales a los citados microorganismos.

Con respecto a las propiedades bioquímicas preliminares y debido a la serie de contratiempos oportunamente señalados a raíz de su similitud, con los integrantes del género *Salmonella*, por lo menos durante los primeros 5 días de incubación a 37°C., recomendamos sumar a las pruebas bioquímicas preliminares (glucosa, manita, lactosa, sacarosa, SH² e indol) un tubo conteniendo medio lactosado el cual una vez sembrado debe cerrarse con tapón de corcho parafinado. En esta forma es posible muchas veces acortar el tiempo de aparición de la fermentación de lactosa.

RESUMÉN Y CONCLUSIONES

a) Con el objeto de investigar las relaciones serológicas entre las bacterias del género *Salmonella* y las bacterias que fermentan lentamente lactosa se han estudiado 176 «Fermentadores lentos» de los cuales 54 presentaron relaciones serológicas frente a sueros preparados con las bacterias del género *Salmonella*, *S. coli* (Kauffmann) o los tipos serológicos descriptos últimamente por Peluffo, Edwards y Bruner.

b) Las relaciones serológicas se investigaron utilizando el método aglutinante y posteriormente la absorción de las aglutininas, demostrando ser en gran parte parciales. Los «Fermentadores lentos» que acusaron títulos somáticos superiores a 1:30 y flagelares superiores a 1:160 fueron sometidos al análisis antigénico (absorción cruzada de las aglutininas).

c) El análisis antigénico emprendido ha permitido hasta este momento precisar 2 grupos para los que se proponen las siguientes fórmulas serológicas: XXXII. x^4 .—.; y E (C) . x^5 .—.; en donde los símbolos E; x^4 y x^5 se mencionan por primera vez. La variación de fase mediante selección natural o por el método de la inducción artificial, no pudo obtenerse.

El análisis antigénico de los «Fermentadores lentos» restantes se ha entorpecido debido en unos casos a la gran complejidad antigénica y en otras a la persistente variación «R».

d) Se señalan en el texto los contratiempos que se presentan al clasificar «Fermentadores lentos» de lactosa cuyas propiedades bioquímicas y serológicas de orientación son similares a las que presentan las bacterias del género *Salmonella*. Se sugiere también la utilización de un tubo conteniendo medio lactosado el que una vez sembrado se cerrará con un tapón parafinado agregándolo a las propiedades bioquímicas preliminares. Este proceder resulta muchas veces de utilidad debido a que acorta el tiempo de aparición de la fermentación de lactosa. Con todo se estima la conveniencia de investigar sobre este punto.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

a) With the purpose of investigating the serological connections between the bacteria of the *Salmonella* group and of those which slowly ferment lactose, 176 "slow fermenters" have been studied, of which 54 presented serological connections when treated with serums prepared with bacteria of the *Salmonella* group, *S. coli* (Kauffmann) or the serological types lately described by Peluffo, Edwards and Bruner.

b) The serological connections were investigated utilizing the agglutinant method and later the absorption of the agglutinine, proving principally to be partials. The "slow fermenters" which registered somatic indices above to 1:80 and flagelars above to 1:160 were submitted to an antigenic analysis (cross absorption of the agglutinines).

c) The antigenic analysis undertaken, has, up to the present, permitted us to distinguish two groups for which the following serological formulae are proposed: XXXII. x^4 .-.; and E (C). x^5 .-.; in which the symbols E: x^4 and x^5 - are mentioned for the first time. The variation of phase by means of natural selection or by the artificial induction method could not be obtained. The antigenic analysis of the remaining "slow fermenters" has been hindered owing, in some cases, to the great antigenic complexity, and in others to the persistent "R" variation.

d) In the text are given some of the set-backs which present themselves when classifying "low fermenters" of lactose the biochemical and serological properties of which are similar to those which the bacteria of the *Salmonella* group present. The use of a tube is also suggested containing both lactose which, when sown, should be closed with a paraffined stopper, adding this to the preliminary biochemical properties. This procedure is sometimes very convenient owing to its shortening the period of

apparition of the lactose fermentation, nevertheless it is esteemed better to investigate on this point.

RESUMO E CONCLUSÕES

- a) Com o objecto de investigar as relações serológicas entre as bactérias do gênero *Salmonella* e as bactérias que fermentam lentamente lactose, estudaram-se 176 «Fermentantes lentos» dos quaes 54 apresentaram relações serológicas frente a sôros preparados com as bactérias do gênero *Salmonella*, *S. Coli* (Kauffmann) ou os tipos serológicos descritos ultimamente por Peluffo, Edwards e Bruner.
- b) As relações serológicas investigaram-se utilizando o método aglutinante e posteriormente a absorção das aglutininas, demonstrando ser em grande parte parciais. Os «Fermentantes lentos» que acusaram títulos somáticos superiores a 1:80 e flagelares superiores a 1:160 foram sometidos ao análise antigênico (absorção cruzada das aglutininas).
- c) O análise antigênico empreendido, ha permitido até êste momento precisar 2 grupos para os que se proponem as seguintes fórmulas serológicas: $XXXII.x^4.-.$; e $E(C).x^5.-.$; aonde os símbolos E ; x^4 e x^5 —mencionam-se por primeira vez. A variação de fase mediante selecção natural ou pelo método da indução artificial, não pode obter-se. O análise antigênico do «Fermentantes lentos» restantes entorpeceram-se devido nuns casos á grande complexidade antigênica e noutros á persistente variação «R».
- d) Sinalam-se no texto os contratempos que se presentam ao classificar «Fermentantes lentos» de lactose cujas propiedades bioquímicas e serológicas de orientação são semelhantes ás que presentam as bactérias do gênero *Salmonella*. Sugere-se também a utilidade dum tubo contendo meio lactosado, o que, uma vez semeado se fechará com um tampão parafinado, agregando-lo ás propiedades bioquímicas preliminares. Este proceder resulta muitas vezes de utilidade devido a que encurta o tempo de aparição da fermentação de lactose. Com tudo estima-se a conveniencia de investigar sobre êste ponto.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SOSA, GUILLERMO. — *Tesis*. — Facultad Medicina — Buenos Aires (1942).
- (2) KRISTENSEN, M., BOJLEN K. y KJAER T. — *Zbl. f. Bakt.* I Orig. 134: 318 (1935).
- (3) SANDFORD, B. R. — *J. of Bact.* 41: 77-78 (1935).
- (4) ROELKE, K. — *Zbl. f. Bakt.* I. Orig. 145 (2): 109 (1940).

- (5) PELUFFO, C. A., EDWARDS, P. R. y BRUNER, D. W. — *J. of Inf. Dis.* 70: 185:192 (1942).
- (6) HABS, H. y ARJONA, E. — *Zbl. f. Bakt.* 133: 204 (1935).
- (7) Citado por PELUFFO, C. A.; EDWARDS, P. R. y BRUNER, D. W. (6).
- (8) SCHIFF, F. BORNSTEIN, S. y SAPHRA, I. — *J. Immunol.* 40: 365-372 (1941).
- (9) KAUFFMANN, F. — *Acta. path. Microbiol. Scandinav.* 18: 225 (1941).
- (10) GARD, S. — *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.* 120: 59 (1937).
- (11) GARD, S. y ERIKSON, E. J. — *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.* 122: 54,61 (1939).
- (12) ANDREWES, F. W. — *J. Path. Bact.* 25: 505 (1922).
- (13) HOLN, J. — *Zbl. f. Bakt.* 146: 215 (1940).
- (14) HORMAECHE, E. PELUFFO, C. A. y ALEPPO, P. L. — *Arch. Urug. Med. Cir. y Esp.* 19: 125 (1941).
- (15) CRAIGIE, J. y BRANDON, K. F. — *J. Path. Bact.* 43: 233 (1936).
- (16) PELUFFO, C. A. — Comunicación personal (1943).
- (17) *Rep. of. Proc. Third Int. Congr. f. Microb.* N. Y. (1939).
- (18) QUIROGA, S. S. y MONTEVERDE, J. J. — Jornadas Agronómicas y Veterinarias (1941).
- (19) ZO BELL, C. A. y FELTHAM, C. B. — *J. of Bact.* 28: 169 (1934).
- (20) SIMMONS, J. S. — *J. Inf. Dis.* 39: 209 (1926).
- (21) HOHN, J. y HERRMANN, W. — *Z. Hyg.* 117: 722 (1935).
- (22) BITTER, L. WEIGMANN, F. y HABS, H. — *M. Med. Wschr* 53: 940 (1926).
- (23) STERN, W. — *Zbl. Bakt.* 78: 481 (1916).
- (24) LEVINE, M. EPSTEIN, S. S. y VAUGHN, R. H. — *Amer. J. Publ. Health* 24: 505 (1934).
- (25) BARRITT, M. M. — *J. Path. and Bact.* 42: 441 (1936).
- (26) CHALLINOR, S. W. y RHODES, A. J. — *J. of Hyg.* 39: N° 6 (1939).
- (27) CLARK, W. M. y LUBS, H. A. — *J. Bact.* 2: 1 y 109 (1919).
- (28) CLARK, W. M. y LUBS, H. A. — *J. Inf. Dis.* 17: 160,173 (1915).
- (29) CLARK, W. M. y LUBS, H. A. — *J. Biolog. Chem.* 30: 209 234, (1917).
- (30) HARDEN, A. — *Proc. Roy. Soc.* 77: 424 (1901).
- (31) HARDEN, A. y WALPOLE, G. S. — *Proc. Roy. Soc. (B)* 77: 399 (1906).
- (32) KOSER, S. A. — *J. Bact.* 8: 493 (1923).
- (33) KOSER, S. A. — *J. Bact.* 9: 59 (1924).
- (34) MONTEVERDE, J. J. y FERRAMOLA, R. — *Anales Soc. Científica Argentina* 133: 417 (1942).
- (35) FERRAMOLA, R. y MONTEVERDE, J. J. — *Bol. O. S. N.* — Buenos Aires 15: 265 (1938).
- (36) FERRAMOLA, R. y MONTEVERDE, J. J. — *Bol. O. S. N.* — Buenos Aires 21, 248 (1939).
- (37) PELUFFO, C. A. — Comunicación escrita (1943).