

2 ej
141



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA REACCION DE
SPICER-EDWARDS Y LA REACCION DE COAGLUTINACION
PARA LA DIFERENCIACION DE ANTIGENOS
FLAGELARES DE SALMONELLA.

T E S I S

Para obtener el Título de
B I O L O G O

presenta

ARMANDO NAVARRO OCAÑA



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Página

I. INTRODUCCION.	
A. Definición de la Familia Enterobacteriaceae	1
1. Clasificación y Nomenclatura de la Familia.	
B. Antígenos de las enterobacterias.	4
C. Definición del género <u>Salmonella</u> .	5
1. Especies del género.	
2. Antígenos somáticos en <u>Salmonella</u> .	
3. Antígenos flagelares en <u>Salmonella</u> .	
a) Variación de fase.	
D. Coagulación.	9
1. Mecanismo de acción del <u>Staphylococcus aureus</u> en la reacción de coagulación.	
II. OBJETIVOS.	11
III. HIPOTESIS.	12
IV. MATERIAL Y METODOS.	13
V. RESULTADOS	16
VI. DISCUSION.	20
VII. CONCLUSIONES	23
VIII. REFERENCIAS.	24
IX. CUADROS Y FIGURAS.	27

RESUMEN.

Se realizó un estudio comparativo para la identificación de antígenos flagelares (H) de Salmonella mediante los métodos de aglutinación en tubo con sueros de Spicer-Edwards y la reacción de coaglutinación empleando una cepa de Staphylococcus aureus Cowan I (NCTC 8530). Se tipificaron por ambos métodos 39 serotipos de Salmonella pertenecientes a 8 serogrupos del esquema antigénico de Kauffmann-White. Cada uno de los serogrupos con diferentes serotipos incluía salmonelas monofásicas y bifásicas. El análisis estadístico de las pruebas de aglutinación en tubo y coaglutinación indicaron que la reacción de coaglutinación fue más sensible y más específica que la reacción clásica de aglutinación en tubo, ya que se pudieron demostrar por coaglutinación antígenos flagelares existentes que no fueron detectadas por el método clásico.

I. INTRODUCCIÓN.

A. Definición de la familia Enterobacteriaceae.

Para poder referir la clasificación del género -- Salmonella es necesario describir primero a la familia - - - Enterobacteriaceae y la clasificación a la cual pertenece este género. De acuerdo con Edwards y Ewing¹, la familia comprende bacterias gram negativas no formadoras de spora, aerobias o anaerobias facultativas. Son bacilos rectos que crecen bien en medios de cultivos artificiales. Algunas especies presentan flagelos aunque también se pueden encontrar variantes inmóviles. Las formas móviles son peritricas. Las enterobacterias reducen los nitratos a nitritos y fermentan la glucosa con formación de ácido o bien de ácido y gas. La prueba de indofenol oxidasa es negativa, así como la licuefacción - del alginato.

1. Clasificación y nomenclatura de la Familia.

Respecto a la clasificación y nomenclatura de la familia Enterobacteriaceae, Edwards y Ewing¹ la agrupan en cinco tribus con sus respectivos géneros y especies tipo.

Familia ENTEROBACTERIACEAE Rahn.

Tribu I ESCHERICHIIEAE Bergey, Breed y Murray.

Género I Escherichia Castellani y Chalmers.

1. Escherichia coli (Migula) Castellani y Chalmers.

Género II Shigella Castellani y Chalmers.

1. Shigella dysenteriae (Shiga) Castellani y Chalmers.
2. Shigella flexneri Castellani y Chalmers.
3. Shigella boydii Ewing.
4. Shigella sonnei (Levin) Welding.

Tribu II EDWARDSIELLEAE Ewing y McWhorter.

Género I Edwardsiella Ewing y McWhorter.

1. Edwardsiella tarda Ewing y McWhorter.

Tribu III SALMONELLEAE Bergey, Bred y Murray.

Género I Salmonella Lignieres.

1. Salmonella cholerae-suis (Smith)Welding
2. Salmonella typhi (Schroeter) Warren y Scott.
3. Salmonella enteritidis (Gaertner) Castellani y Chalmers.

Género II Arizona Ewing y Fife.

1. Arizona hinshawii (Ewing y Fife) Ewing.

Género III Citrobacter Werkman y Gillen.

1. Citrobacter Freundii (Braak) Werkman y Gillen.

Tribu IV KLEBSIELLEAE Trevisan.

Género I Klebsiella Trevisan.

1. Klebsiella pneumoniae (Schroeter) Trevisan
2. Klebsiella ozaenae (Abel) Bergey, Bred y Murray.
3. Klebsiella rhinoschleromatis Trevisan.

Género II Enterobacter Hormaeche y Edwards.

1. Enterobacter cloacae (Jordan) Hormaeche y Edwards.
2. Enterobacter aerogenes (Kruse) Hormache y Edwards.
3. Enterobacter hafniae (Moeller) Ewing.
4. Enterobacter liquefaciens (Grimes y Hennerty) Ewing.

Género III Pectobacterium Waldee.

1. Pectobacterium carotovorum (Jones) Waldee

Género IV Serratia Bizio.

1. Serratia marcescens (subspecies marcescens) Bizio.
- 1a. Serratia marcescens (subspecies killiensis) Ewing, Davis y Johnson.

Tribu V PROTÉEAE Castellani y Chalmers.

Género I Proteus Hauser.

1. Proteus vulgaris Hauser.
2. Proteus mirabilis Hauser.
3. Proteus morgani (Winalow, Kigler y Rothberg) Rauss.

4. Proteus rettgeri (Hadley et al) Rustigian y Stuart.

Género II Providencia Ewing.

1. Providencia alcalifaciens (De Salles - - Gomes) Ewing.
2. Providencia stuartii (Buttiaux et al) - - Ewing.

B. Antígenos en las Enterobacterias.

La tipificación serológica completa de la familia - Enterobacteriaceae se hace con la determinación de antígenos O (somáticos), H (flagelares) y K (capsulares).

Antígenos somáticos O (del alemán Ohne Hauch). Estos antígenos son termestables. Su composición está dada por complejos fosfolípidos-polisacáridos. El análisis de los antígenos O revela - una composición de polisacáridos (60%), lípidos (20-30%) y hexosaminas (3.5-9.5%). Son resistentes al alcohol y a los ácidos. La naturaleza de los grupos terminales del polisacárido y el orden en que - se encuentran en unidades repetidas en las cadenas laterales dan como resultado la especificidad de numerosos tipos de antígenos O.

Antígenos flagelares H (del alemán Hauch). Son antígenos termolábiles que se encuentran como flagelos de las bacterias. Están compuestos de una proteína llamada flagelina. El contenido de aminoácidos y el orden en que se encuentran en la flagelina determinan la especificidad de los antígenos H.

Antígenos K (del alemán Kapsel). Son antígenos que se encuentran como cápsulas. Estos antígenos en su mayoría son termolábiles y de naturaleza polisacárida.

C. Definición del género Salmonella.

Teniendo en cuenta la clasificación, nomenclatura y definición de la familia Enterobacteriaceae, se puede referir más ampliamente al género Salmonella. Según la definición^{1,2}, las salmonelas son bacilos rectos, gram negativos, que poseen flagelos peritricos. Producen ácido de glucosa, manitol, sorbitol y del medio de tartrato de Jordan. La mayoría produce H₂S. La prueba de rojo de metilo es positiva. Reduce los nitratos a nitritos. Utilizan el citrato de sodio. Descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina. No fermentan lactosa, sacarosa, salicina ni adonitol. No producen acetilmetilcarbinol, ureasa o indol. No utilizan el malonato de sodio. No licúan la gelatina, ni crecen en medio de KCN. La especie tipo es Salmonella cholerae-suis (Smith) Welding.

1. Especies del género.

Dentro del género Salmonella se reconocen tres especies³. La limitación a sólo tres especies de Salmonella tiene su origen con Borman en 1944⁴; el empleo de tres especies en este género fue adoptado por Kauffmann y Edwards en 1952⁵ y Ewing en 1963⁶. Las especies reconocidas del género son: Salmonella cholerae-suis, Salmonella typhi y Salmonella enteritidis. Las designaciones infraespecíficas son equivalentes o bien usadas en lugar de fórmulas antigénicas, como es el caso de los serotipos.

En cuanto a la designación de los serotipos de las tres especies es como sigue: Para las dos primeras especies, es decir para S. cholerae-suis y S. typhi, su designación como serotipo (ser) es con el nombre de la especie. Todos los demás serotipos conocidos, más de 1400, se incluyen como S. enteritidis aclarando que la designación que se les da a los serotipos de S. enteritidis son - infrasubespecíficos y no tienen rango en la nomenclatura³. Los serotipos y bioserotipos (bioser) se designan como sigue:

- S. enteritidis ser Typhimurium
- S. enteritidis ser Heilderberg
- S. enteritidis ser Enteritidis
- S. enteritidis bioser Paratyphi-A

2. Antígenos somáticos en Salmonella.

Para la clasificación y caracterización de los serotipos de Salmonella mediante el análisis antigénico es necesario realizar primero el estudio del antígeno somático termocostable. Los antígenos O de Salmonella se designan por números arábigos progresivos del 1 al 64, aunque en el esquema antigénico los números 29, 31, 32, 33, 49, 62 y 63 no corresponden a antígenos de Salmonella sino pertenecen a otros géneros diferentes pero incluidos en la Tribu - - Salmonelleae. Por ejemplo, los antígenos 62 y 63 pertenecen al género Arizona y los antígenos 29, 31, 32 y 33 pertenecen al género - - Citrobacter. El antígeno 49 ha sido eliminado del esquema antigénico.

Los serogrupos de Salmonella se determinan por sus antígenos somáticos. La mayoría de las salmonelas poseen más de un antígeno somático encontrándose muchas que poseen antígenos somáticos comunes. En base a ésto se clasifican los serogrupos, los cuales

se designan por letras latinas mayúsculas de A - H, K, L y N⁷.

3. Antígenos flagelares de Salmonella.

Son antígenos que se encuentran en los flagelos de - las bacterias y su identificación es necesaria para la tipificación completa de las especies. Los antígenos flagelares de Salmonella se determinan usando selectivamente antisueros representativos de estos antígenos que poseen los miembros del género. Los antígenos H se - identifican con letras latinas minúsculas. La serie completa va des de la "a" hasta la "z" exceptuando el antígeno "j" que no se expresa en el esquema. La limitación del alfabeto ha hecho necesario poner sufijos a la "z", la serie va de z₁ a z₅₉, sin embargo, algunos de - estos antígenos no se expresan en el esquema antigénico o no se iden - tifican en la práctica. Se debe de entender que esta designación - del antígeno "z" no es una subdivisión del mismo, sino que cada uno de estos antígenos es una entidad por separado.

a) Variación de Fase.

Las variaciones bacterianas se deben fundamentalmen - te a dos procesos: 1) Mutación y selección que dan lugar a pobla - ciones con cambios de tipo genético y 2) Variabilidad fenotípica - (adaptación fisiológica). Las variaciones fenotípicas son general - mente inducidas por agentes externos, afectan al total de la pobla - ción pero no son hereditarios, son inestables y reversibles, inte - rrumpiéndose cuando el agente inductor deja de manifestarse. En tan - to las variaciones genotípicas afectan a un número reducido de célu - las de la población, son estables, hereditarias y no reversibles⁸.

La variación de fase en Salmonella se puede definir como la expresión fenotípica en la cual un serotipo puede expresar -

sus antígenos flagelares en dos formas antigénicas diferentes. Estas dos formas antigénicas son conocidas como fase específica y fase no específica. La variación de fase fue descubierta por Andrewes en 1922 en S. typhimurium. Andrewes demostró las fases específicas y no específicas en base a que cuando se cultivaban dos serotipos de Salmonella con antígenos flagelares relacionados, sólo algunas colonias aglutinaban con antisuero del tipo homólogo. Las colonias que aglutinaban sólo con el antisuero homólogo se les denominó de fase específica, mientras que las colonias que aglutinaban tanto con el antisuero homólogo como con un antisuero heterólogo se designaron de fase no específica. Se demostró además que las fases específicas contenían trazas de componentes no específicos y las fases no específicas llevaban también pequeñas cantidades de factores específicos. Los antisueros producidos con fases específicas aglutinaban al antígeno homólogo a diluciones elevadas y tenían títulos muy bajos para algunos antígenos heterólogos.

Lederberg⁹, ¹⁰ señaló que la variación de fase involucra a dos loci H_1 y H_2 alternativamente. Mediante experimentos de transducción demostró que cada fase corresponde a la expresión de distintos locus; así los antígenos flagelares de fase específica - estaban codificados por el locus H_1 y los antígenos de fase no específica por el locus H_2 . Por lo tanto las fases antigénicas H están determinadas por estados alternos del locus H_2 , el cual se expresa fenotípicamente al mismo tiempo que reprime la función del locus H_1 . Alternativamente cuando el locus H_2 se inactiva permite la expresión del locus H_1 . Los factores H_1 y H_2 son funcionalmente complementarios. El factor H_1 no varía con los estados del locus H_2 y su actividad depende del factor H_2 . En base a esto, la variación de fase - representa un tipo de evento espontáneo en donde la información no se altera, sino se reprime temporalmente.

En algunas ocasiones un serotipo difásico sólo expresa una de las fases antigénicas pero no las dos a la vez^{10, 11}. Es

importante tener presente que cuando se encuentra sólo una de las - fases en un cultivo difásico es indispensable hacer supresión de fase con el objeto de encontrar la fase que no se está expresando^{1, 12.}

No todos los serotipos de Salmonella son difásicos, muchos serotipos son monofásicos y en éstos cada colonia contienen - antígenos flagelares idénticos. La mayoría de los serotipos monofásicos reconocidos contienen antígenos "g" o "m"; aún así, en los casos en que sólo se encuentra una fase flagelar es necesario tratar - de aislar la segunda fase, la cual puede estar temporalmente reprimida. Este intento es necesario para estar seguros de que el serotipo es monofásico^{13.}

Los antígenos flagelares de fase no específica de - numerosas salmonelas se designan por números arábigos; la serie incluye los números 1, 2, 4, 5, 6 y 7. Estos antígenos de fase no específica se pueden encontrar en las siguientes combinaciones según - el serotipo 1, 2; 1, 5; 1, 6; 1, 7. Algunos antígenos flagelares de esta fase se designan también por letras minúsculas, como es el caso de los antígenos e, n, x; e, n, z₁₅, que se designan como e, n.

D. Coaglutinación.

La reacción de coaglutinación fue descrita por - - Kronvall en 1973. Este método ha sido señalado como una técnica serológica sencilla y rápida para el diagnóstico de infecciones causadas por microorganismos^{14, 15, 16}. Para la realización de la reacción se utiliza la cepa de Staphylococcus aureus (S. aureus) Cowan I. Esta cepa tiene la particularidad de poseer abundante proteína A en su pared celular. Para su uso la cepa Cowan I se debe de tratar con formaldehído y calor ya que este tratamiento combinado estabiliza la proteína A en la pared celular, al mismo tiempo que se inactivan - -

enzimas responsables de autólisis celular¹⁵.

1. Mecanismo de acción de S. aureus en la coagulación.

Cuando una inmunoglobulina (Ig) se trata con papaína se obtienen tres fragmentos, dos fragmentos Fab y un fragmento Fc¹⁷. Los fragmentos Fab se conocen como fragmentos ligadores de antígeno o como sitios activos de la Ig. Durante algún tiempo se investigó - el mecanismo de acción del S. aureus Cowan I en la reacción de coagulación proponiendo que al forrar estas bacterias con un antisue- ro las porciones libres reaccionaban con la IgG del suero. El meca- nismo propuesto¹⁸ fue el siguiente: la reacción de la proteína A - con los anticuerpos es a la inversa de como lo hacen los antígenos, es decir, la reacción es Fc-proteína A y no Fab-proteína A. De esta manera la unión Fc-proteína A permite que los sitios activos de las inmunoglobulinas queden libres y puedan reaccionar con antígenos es- pecíficos¹⁹ (Figuras 1 y 2).

Mediante esta técnica se han investigado antígenos de algunos microorganismos^{20, 21, 22}. Hanovec²¹ lo ha usado en el - diagnóstico e identificación de serogrupos de Escherichia coli - - - (E. coli) asociados a infecciones del tracto urinario; Kronvall¹⁵ en la tipificación de pneumococos y Christensen¹⁴ en la tipificación de estreptococos. Con esta técnica se ha investigado también la presen- cia de antígeno común de enterobacterias (ECA) en lipopolisacáridos - crudos de E. coli y Salmonella en fracciones solubles e insolubles - de estas cepas^{23, 24}, la presencia de antígenos de Haemophylus - - influenzae tipo b en líquido cefalorraquídeo²⁵ y antígenos de - - Salmonella typhi en orina de pacientes con fiebre tifoidea²⁶. En el presente trabajo se ha utilizado por primera vez este método como - una alternativa para la tipificación de antígenos flagelares de - - Salmonella.

11. OBJETIVOS.

Uno de los problemas fundamentales para conocer en nuestro medio qué organismos infectan a nuestra población y en este caso en particular, las salmonelas, es poder clasificarlas con precisión para conocer los tipos más frecuentes asociados a procesos infecciosos. Desgraciadamente los procedimientos para efectuar esta tipificación son difíciles ya que para este fin se requiere un gran número de antisueros contra los diferentes grupos somáticos y flagelares. En este último caso la metodología se complica por la cantidad de antisueros empleados y por las numerosas reacciones cruzadas que presentan. Spicer en 1956²⁷ propuso un esquema de cuatro combinaciones de antisueros para encontrar los antígenos flagelares más comunes de Salmonella. Aprovechando este procedimiento se realizó el presente estudio comparando la técnica de Spicer con la técnica de coaglutinación con S. aureus Cowan I (cepa NCTC 8530). El estudio por lo tanto tiene como objetivo comparar la rapidez, especificidad y sensibilidad de ambos métodos.

III. HIPOTESIS.

La reacción de coaglutinación permite la identificación de antígenos flagelares de Salmonella de manera precisa y confiable, comparado con el método establecido por Spicer y Edwards.

IV. MATERIAL Y METODO.

1. Se estudiaron 39 cepas de Salmonella pertenecientes a los serogrupos de Kauffmann-White (Cuadro 1). Estas cepas de Salmonella se obtuvieron de dos fuentes: a) Del Instituto Nacional de Ciencias y Tecnología-DIF (INCYTAS-DIF), con algunas cepas tipificadas en la División de Patógenos Entéricos del Laboratorio Central de Salud Pública en Londres Inglaterra, gracias a la amabilidad del Dr. Bernard Rowe; y b) Cepas proporcionadas gracias la gentileza del Dr. William Ferguson del Departamento de Salud del Estado de Michigan, Estados Unidos.

Las cepas utilizadas fueron confirmadas como salmonelas de acuerdo a las siguientes reacciones bioquímicas: Fermentación de glucosa y lactosa; producción de indol, ureasa, diacetilmetilcarbinol (Voges-Proskaguer); producción de ácido indicado con - rojo de metilo; descarboxilación de lisina y ornitina; crecimiento en caldo de malonato de sodio y de gluconato; producción de ácido sulfhídrico; prueba de movilidad y reacción de la fenilalanina.

2. Preparación del S. Aureus Cowan I (NCTC 8530). - Para su utilización en la reacción de coagulación, se sembró esta cepa en 15 cajas de Petri de 100 x 10 conteniendo agar de soya triptica (TSA). Se incubaron durante 18 a 24 horas a 37°C. El crecimiento bacteriano en cada caja se cosechó con 10ml de solución salina 0.15 M. Se lavó tres veces por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C; a la pastilla de la última centrifugación se le agregaron 37ml de solución formolada (36.5ml de solución salina - 0.15M de formaldehído a 37%). Se homogenizó y se dejó reposar durante 90 minutos a temperatura ambiente; después se lavó tres veces por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La última pastilla se suspendió en 30ml de solución salina 0.15M y se calentó a 80°C durante 30 minutos. Después de este tratamiento se lavó la

suspensión tres veces como ya se describió y se ajustó a 1000 Unidades Klett con solución salina 0.15M, agregándose azida de sodio - - (0.1%) como conservador. La suspensión se guardó a 4°C hasta el momento de su uso.

3. Aglutinación en tubo. Para la obtención de antígenos flagelares se realizaron siembras sucesivas de las cepas en medio de cultivo semisólido de acuerdo al método de Craig¹. Una vez que los cultivos habían desarrollado los flagelos se crecieron en caldo TSA y se incubaron 18-24 horas a 37°C. A estos cultivos se les adicionó un volumen igual de solución salina formolada al 0.6% y se dejaron a temperatura ambiente durante dos horas. A 0.5ml de esta suspensión se le adicionó 0.5ml de cada uno de los antisueros flagelares. La suspensión se colocó en baño serológico a 48-50°C, leyéndose la aglutinación una hora después de incubarse.

En el Cuadro 2 se presentan los factores antigénicos que contienen los sueros de Spicer-Edwards. Para efectuar la aglutinación en tubo, se procedió primero a titular los sueros flagelares de tipo Spicer-Edwards 1, 2, 3, y 4 (Difco) con una cepa monofásica (S. typhi) y una cepa bifásica (S. enteritidis ser Typhimurium). Los antígenos flagelares de estas cepas se incubaron durante una hora a 50°C a diferentes diluciones con los sueros flagelares antes mencionados. Se tomó como título la dilución más alta que produjera aglutinación franca con los antígenos empleados. Por otra parte todos los antígenos flagelares se aglutinaron empleando un suero flagelar polivalente obtenido del Center for Disease Control (CDC) de los Estados Unidos en Atlanta, Georgia.

4. Coaglutinación. Para la reacción de coaglutinación primero se forró el S. aureus Cowan I con cada uno de los sueros flagelares de Spicer-Edwards (Difco) sin diluir y diluidos 1:4, 1:8, 1:32. El S. aureus Cowan I se forró también con el suero polivalente H. Para hacer el forramiento la suspensión original de - -

1000 UK de S. aureus Cowan I (Cowan) se diluyó 1:4 con solución salina 0.15M. A 1 ml de Cowan diluido 1:4 se le adicionaron 0.1 ml de cada una de las diluciones de los antisueros flagelares. La reacción de coaglutinación se realizó en laminilla con 10 µl de Cowan forrado con cada uno de los antisueros flagelares y 10 µl de la suspensión bacteriana formulada de cada una de las cepas de Salmonella. En otros casos los mismos antígenos flagelares se dejaron a 4°C durante toda la noche y al día siguiente se lavaron dos veces con solución salina 0.15M ajustando la concentración al volumen original.

Para estar seguros del grado de especificidad de la reacción de coaglutinación, se emplearon 4 cepas de Salmonella bifásicas. Por un lado los cultivos de estas cepas se emplearon formulados y por otro los mismos cultivos se emplearon calentados a 100°C durante 60 minutos. Los cultivos formulados y calentados se coaglutinaron empleando el Cowan forrado con los sueros anti-H y anti-O correspondientes a los antígenos de las cepas formuladas.

V. RESULTADOS.

Las 39 cepas de Salmonella estudiadas correspondieron a diferentes serogrupos del esquema antigénico de Kauffmann White como puede verse en el Cuadro 1. Las cepas estudiadas pertenecían a 8 serogrupos, algunos de ellos representados sólo por un serotipo, - como es el caso del ser Paratyphi-A, mientras que otros representados por varios, como es el caso del serogrupo E₄ con nueve cepas. - El empleo de diversos serotipos sirvió para corroborar la sensibilidad de ambos métodos en la investigación de las fases flagelares específica y no específica.

Todas las cepas estudiadas presentaron reacciones - bioquímicas características de Salmonella (Cuadro 3). Esto es, fermentaron la glucosa con formación de ácido y gas, produjeron H₂S, - tuvieron movilidad positiva y descarboxilaron la lisina y la ornitina. No fermentaron la lactosa, fueron negativas en la producción de Indol y de acetilmetilcarbinol (Voges-Proskaguer). No utilizaron el malonato de sodio ni el gluconato de potasio; la reacción de la - - fenilalanina fue negativa. Todas las lecturas de las pruebas bioquímicas se realizaron a las 18-24 horas de incubación. Una cepa - - (4570-2) fue bioquímicamente aberrante pues presentó reacciones positivas en los caldos malonato de sodio y gluconato de potasio.

El Cuadro 4 muestra las frecuencias de cepas de - - Salmonella que dieron reacción positiva con uno u otro método empleado. El 74% de las cepas pudieron tipificarse de acuerdo con sus - - antígenos flagelares usando el método de aglutinación en tubo mientras que con el método de coaglutinación se pudieron tipificar el - 92%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$, por χ^2 de proporciones).

El análisis de los porcentajes de cepas que pudieron tipificarse por cada método de acuerdo con el suero de Spicer-Edwards fue mayor en todos los casos usando la coaglutinación (Cuadro 4). - Sin embargo esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa por prueba de χ^2 de proporciones en el caso de los sueros 1 ($p < 0.01$) y 3 ($p < 0.05$). El resultado total demuestra que la coaglutinación - fue superior a la aglutinación en tubo para la tipificación serológica del grupo de cepas de Salmonella estudiado.

En el Cuadro 5 se presentan los serotipos que fueron estudiados, con sus correspondientes antígenos somáticos y flagelares de fase específica. Se presenta también la combinación de sueros Spicer-Edwards necesarios para identificar los antígenos flagelares y el número de éstos identificados por ambos métodos utilizados. Por aglutinación en tubo se pudieron identificar 3 antígenos "b" del ser Ohio; 1 antígeno "c" del ser S. cholerae suis; 2 antígenos "d" - del ser S. typhi; 1 antígeno "d" del ser Shangani; 9 antígenos "e, - h"; 6 antígenos "g, s, t" del ser Senftenberg; 5 antígenos "i" del - ser Typhimurium; y 3 antígenos "l, v" del ser Panama. Mediante este método se identificaron 31 antígenos flagelares de fase específica. No se pudieron identificar por el método anterior 2 antígenos "a" - correspondientes a los serotipos Paratyphi-A y Archaveleta; 2 antígenos "e, h" del ser Anatum; 3 antígenos "i" del ser Typhimurium y 1 antígeno "l, v" del ser Panama.

Por la reacción de coaglutinación se identificaron - 39 antígenos flagelares: 2 antígenos "a" de los ser Paratyphi-A y - Archaveleta; 3 antígenos "b" del ser Ohio; 1 antígeno "c" de - - S. cholerae-suis; 3 antígenos "d"; 2 de S. typhi y 1 del ser - - Shangani; 11 antígenos "e, h"; 6 del ser Newport, 4 del ser Anatum, 1 del ser Newington; 7 antígenos "g, s, t" del ser Senftenberg; 8 - antígenos "i" del ser Typhimurium y 4 antígenos "l, v" del ser - - Panama. En el caso de la coaglutinación se identificaron antígenos flagelares de cada uno de los tipos estudiados demostrándose una -

mayor sensibilidad de este método sobre la aglutinación en tubo de los antígenos flagelares de fase específica. La diferencia entre los dos métodos fue estadísticamente significativa ($\chi_p^2 = 8.91$, gl 1, $p < 0.001$).

El estudio de los antígenos flagelares de fase no específica se presenta en el Cuadro 6. Por aglutinación en tubo se identificaron 16 (55.1%) de 29 de estos antígenos; 3 antígenos 1, 2 del ser Typhimurium; 2 antígenos "1, w" del ser Ohio; 4 antígenos 1, 2 del ser Newport; 1 antígeno 1, 5 del ser Panama; 1 antígeno 1, 5 del ser Shangani; 4 antígenos 1, 6 del ser Anatum; 1 antígeno 1, 6 del ser Newington. Mediante este método no se pudieron identificar: 1 antígeno 1, 7 del ser Arechaveleta; 5 antígenos 1, 2 del ser Typhimurium; 1 antígeno "1, w" del ser Ohio; 1 antígeno 1, 5 de S. cholerae-suis; 2 antígenos 1, 2 del ser Newport; 3 antígenos 1, 5 del ser Panama.

Por lo que respecta a la reacción de coaglutinación se identificaron 21 (72.4%) de 29 antígenos de fase no específica: 1 antígeno 1, 7 del ser Arechaveleta; 6 antígenos del ser Typhimurium; 2 antígenos "1, w" del ser Ohio; 1 antígeno 1, 5 de S. cholerae-suis; 4 antígenos 1, 2 del ser Newport; 1 antígeno 1, 5 del ser Panama; 1 antígeno 1, 5 del ser Shangani; 4 antígenos 1, 6 del ser Anatum; 1 antígeno 1, 6 del ser Newington. Por otra parte con este método no se identificaron: 2 antígenos 1, 2 del ser Typhimurium; 1 antígeno "1, w" del ser Ohio; 2 antígenos 1, 2 del ser Newport; 3 antígenos 1, 5 del ser Panama. El análisis estadístico de los porcentajes de cepas tipificadas por ambos métodos muestra que la diferencia no fue significativa ($\chi_p^2 = 1.86$, gl 1, $p > 0.2$).

Con el objeto de estudiar la especificidad del método de coaglutinación para la identificación de antígenos flagelares de Salmonella se compararon los resultados del ensayo utilizando preparaciones de antígeno formulado sin calentar y calentados a 100°C.

El resultado obtenido de este experimento (Cuadro 7) demuestra que - mientras el calentamiento de los antígenos de 4 cepas con antígenos somáticos 6, 8 no afecta su detección serológica, la coaglutinación fue negativa con los antígenos flagelares "e, h" de estas cepas al - coaglutinarse después de calentados.

Estos resultados confirman la especificidad del método de coaglutinación para la detección de antígenos flagelares de - Salmonella. La aglutinación en tubo con antisueros de Spicer-Edwards utilizando antígenos flagelares calentados 60 minutos a 100°C fue - igualmente negativa.

VI. DISCUSION.

El objetivo principal de una identificación lo más completa posible de una bacteria es poder hacer una relación entre el tipo de microorganismo aislado de un individuo con la presencia de una sintomatología clínica específica. Así, el descubrimiento del Mycobacterium tuberculosis o del Vibrio cholerae permitió a Koch confirmar la teoría bacteriana de las infecciones, planteada unos años antes por Pasteur en enfermedades de animales. La asociación precisa entre cierto tipo de cuadros clínicos con la presencia de un tipo específico de gérmenes aislados de esos individuos y la réplica de esa enfermedad en otros individuos inoculados con estos mismos microorganismos, como postulados de Koch, es el principio de la etiopatogenia de los diversos padecimientos infecciosos.

La tipificación bacteriana a partir de entonces ha sido un interés constante del investigador en microbiología aplicada. Durante el presente siglo Kauffmann⁷, y posteriormente otros investigadores europeos, diseñaron sistemas serológicos que permitieron la tipificación de diferentes enterobacterias que causan enfermedades infecciosas en humanos y animales.

En el caso de Salmonella la identificación de especies de este género a través del uso de sueros específicos para detectar sus antígenos somáticos y flagelares ha permitido la clasificación de estas bacterias en grupos de acuerdo con el hospedero en donde se aíslan y el tipo de sintomatología que producen cuando los colonizan e infectan. Se sabe ahora que el aislamiento de Salmonella typhi de heces, sangre, médula ósea o lesiones en piel es indicativo de que ese paciente tiene una fiebre tifoidea y que esta bacteria rara vez se encuentra en hospederos no humanos. Un cuadro similar de enfermedad puede presentarse en roedores pero asociado a la presencia de Salmonella typhimurium. Esta última Salmonella, sin

embargo, puede producir una enteritis severa en un lactante o septicemia en un recién nacido la interacción entre el germen y el hospedero, está condicionada por lo tanto por varios factores que favorecen y permiten el desarrollo de una enfermedad.

En otras ocasiones es factible encontrar bacterias - consideradas como patógenas en ausencia de signos clínicos de enfermedad. El estado de portador es un problema importante desde el punto de vista epidemiológico, pues el individuo que excreta un germen patógeno es frecuentemente una fuente de infección para otros. En el caso de Salmonella typhi existen varios reportes de epidemias de fiebre tifoidea causada por alimentos contaminados por manejadores - de comida portadores de este germen²⁸. La detección de individuos - portadores en países con alta incidencia de fiebre tifoidea como - Chile²⁹ es de gran importancia para la prevención de esta enfermedad.

La identificación de cepas de Salmonella a nivel clínico se puede realizar a través de medios bioquímicos que son comunes para estas bacterias y se presentan con mayor frecuencia estadística en miembros de estas especies. Las reacciones bioquímicas, sin embargo, pueden ser aberrantes en ocasiones y no permitir la clasificación correcta de un germen como Salmonella. Salmonelas capaces de fermentar lactosa se han aislado de casos severos en Brasil³⁰. En estas circunstancias la tipificación bioquímica de estos gérmenes - puede impedir su identificación correcta al desecharse estas bacterias por pensarse que pertenecen a especies no patógenas. Se necesita entonces un sistema de tipificación más fino que permita al investigador una identificación más precisa de estas bacterias.

El esquema serológico de Kauffmann modificado posteriormente por White y llevado al día por Le Minor y Bockemuhl³¹ es - sumamente extenso y complicado para uso en laboratorios que sean de referencia. por esta razón Spicer y Edwards^{27, 1} diseñaron un sistema de clasificación más accesible basado en la identificación de 5 -

grupos de antígenos flagelares. Con este sistema ha sido posible - identificar con mayor seguridad salmonelas aisladas de diferentes - hospederos. El uso de estos antisueros representa un costo grande - para países como el nuestro con recursos limitados para proyectos de investigación epidemiológica. El uso del método de coaglutinación - unido al sistema de Spicer-Edwards aumenta la especificidad y sensibilidad de este último disminuyendo importantemente su costo, como - lo demuestran los resultados presentados en el presente trabajo. El uso de antisueros diluidos unidos a la proteína A del Staphylococcus aureus Cowan I permite un uso más racional de estos reactivos tan - caros, sin el peligro de que la dilución disminuya la calidad de la prueba.

En estudios epidemiológicos longitudinales para conocer la etiología de procesos diarreicos o en brotes de enfermedades por cepas de Salmonella se puede ahora estudiar un número grande de cepas a un costo razonable y con una certeza mayor si se utiliza el sistema de coaglutinación.

El desarrollo de estas técnicas permitirá la cuantificación más precisa de gérmenes que infectan a la población local, y quizá más importante, el conocimiento de las fuentes de infección a fin de que se puedan plantear medidas más específicas para su control.

VII. CONCLUSIONES.

1. Se confirma la hipótesis propuesta al principio de este trabajo, ésto es mediante el método de coagulación se pueden identificar los antígenos flagelares de Salmonella de una manera confiable.

2. El presente trabajo mostró que el S. aureus - - Cowan I forrado con los sueros de Spicer-Edwards, es un método más sensible y específico que la aglutinación en tubo en la identificación de antígenos flagelares, por lo menos en fase específica.

3. La identificación de los antígenos flagelares de Salmonella mediante la coagulación es mucho más rápida y sencilla que la aglutinación en tubo. Además que la coagulación resulta más barata que la aglutinación en tubo dado que el método no requiere reactivos adicionales ni equipo.

4. La serotipificación de las tres especies del género Salmonella se puede realizar con el método de coagulación - usando los antisueros de Spicer-Edwards.

5. Los objetivos planteados en este trabajo se llevaron a cabo en su totalidad, por un lado la reacción de coagulación pudo identificar los antígenos flagelares de las salmonelas y - por otro lado fue posible reducir costos en la identificación de estos antígenos mediante la implementación de un método como es la coagulación, por último también se logró optimizar la sensibilidad - y confiabilidad de la coagulación en la serotipificación.

VIII. REFERENCIAS.

1. Edwards, P.R. and Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3th. ed., Burges: Minneapolis, 1972.
2. Buchanan, E.R. and Gibbons, E.N., Ed., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., Williams and Wilkins: Baltimore, 1974.
3. Ewing, W.H. The nomenclature of Salmonella, its usage, and definitions for the three species. Can. J. Microbiol., 18:1629-1637, 1972.
4. Borman, E.K., Stuart, C.A. and Wheeler, K.M. Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. J. Bacteriol., 48:351-367, 1965.
5. Kauffmann, F., and Edwards, P.R. Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 2:2-8, 1952.
6. Ewing, W.H. An outline of nomenclature for the family Enterobacteriaceae. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 13:105-106, 1963.
7. Kauffmann, F., and Edwards, P.R. A revised, simplified Kauffmann-White schema. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 41:242-246, 1957.
8. Braun, W. Bacterial Genetics, 2nd. ed., Saunders: Philadelphia, 1965.
9. Lederberg, J. and Iino, T. Phase variation in Salmonella. Genetics, 41:743-746, 1956.
10. Iino, T. Curly flagellar mutants in Salmonella. J. Gen. Microbiol., 27:167-175, 1962.
11. Lennette, E.H. Manual of Clinical Microbiology. 3th. ed. American Society for Microbiology: Washington, 1980.
12. Edwards, P.R., West, G.M. and Bruner, W.D. A group of diphasic paracolony bacteria. J. Infect. Dis., 81:24-28, 1947.
13. Edwards, P.R., Mc Whorter, C.A. and Fife, A.M. Studies on group G of the genus Salmonella. J. Bacteriol., 67:346-349, 1954.

14. Christensen, P. Kahlmeter, G., Jonsson, S., and Kronvall, G. New method for serological grouping of Streptococci with specific antibodies absorbed to protein A containing Staphylococci. Infect. Immun., 7:881-885, 1973.
15. Kronvall, G. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to protein A containing staphylococci. J. Med. Microbiol., 6:187-190, 1973.
16. Thirumoorthi, C.M. and Dajani, S.A. Comparison of staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counter-immunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. J. Clin. Microbiol., 9:28-32, 1979.
17. Fleischeman, J.B., Porter, R.R., and Press, E.M. The arrangement of the peptide chains gammaglobulin. Biochem. J., 88:220-226, 1963.
18. Forsgren, A. and Sjoquist, J. Protein A Staphylococcus aureus I pseudoimmune reaction with human gammaglobulin. J. Immunol., 97:822-827.
19. Brill, M.B., Wasilauskas, L.B. and Richardson, H.S. Adaptation of the Staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., 9:49-55, 1979.
20. García-Tamayo, F. y Drago, E. Demostración de antígenos en productos biológicos por coaglutinación de estafilococos que contienen proteína A. Bol. Med. Hosp. infan. Méx., 39:321-326, 1982.
21. Hovanec, L.D. and Gorzynki, A.E. Coagglutination as an expedient for grouping Escherichia coli associated with urinary tract infections. J. Clin. Microbiol., 11:41-44, 1980.
22. Olgen, F., Danielsson, D. and Kjenllander, J. The use of protein A containing staphylococci sensitized with anti-meningococcal antibodies for grouping Neisseria meningitidis and demonstration of meningococcal antigen in cerebrospinal fluid. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 83B:387-396, 1975.

23. Carrillo, J., Grave, P.M. y García-Tamayo, F. Demostración del antígeno común de enterobacterias (ECA) por la reacción de coaglutinación. Bol. Med. Hosp. Infan. Méx. 39:725-728, 1982.
24. Carrillo, J., Grave, P.M. y García-Tamayo, F. Coaglutinación del Staphylococcus aureus con antígeno común de enterobacterias. Arch. Inves. Med. (Méx), 14:221-226, 1983.
25. Suksanong, M. and Dajani, S.A. Detection of Haemophilus influenzae type b antigens in body fluids using specific antibody-coated staphilococci. J. Clin. Microbiol., 5:81-85, 1977.
26. Rockhill, C.R., Rumans, W.L., Lesmana, M. and Dennis, T.D. Detection of Salmonella typhi D, Vi, and d antigens by slide coagglutination, in urine from patients with typhoid fever. J. Clin. Microbiol., 11:213-216, 1980.
27. Spicer, C.C. A quick method of identifying Salmonella H antigens. J. Clin. Pathol., 9:378-379, 1956.
28. Huckstep, R.L.: Typhoid fever and other Salmonella infections E & Livingston, Ltd., Edinburgh, 1962.
29. Levine, M.M., Kaper, J.B. Black, R.E., and Clements, M.L. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol. Rev., 47:510-550, 1983.
30. Le Minor, L., Coynault, C., et Pessoa, G. Determinism plasmidique da character atypique "lactose positif" de sonches de Salmonella typhimurium et de Salmonella oranienburg isolées lors d'epidemies de 1971-1973. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125A:261-269, 1974.
31. Le Minor, L. and Bockemuhl, J. Supplément No. XXVI au Schéma de Kauffmann-White. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 133B:20-42, 1982.

CUADRO 1

CLAVE DE LA CEPA	SEROGRUPO	S E R O T I P O	FÓRMULA ANTIGÉNICA.	F U E N T E
F ₁	A	<u>S. enteritidis</u> ser Paratyphi-A	2, 12:a:-	Dr. W. Fergunson*
F ₂	B	<u>S. enteritidis</u> ser Arechaveleta	4, 5:a:1, 7	Dr. W. Fergunson*
100, 110, 40, 29, 07, 1000, 01, 600	B	<u>S. enteritidis</u> ser Typhimurium	4, 5:i:1, 2	INCYTAS-DIF.**
050, 070, 079	C ₁	<u>S. enteritidis</u> ser Ohio	6, 7:b:1, w	INCYTAS-DIF.**
F ₅	C ₁	<u>S. cholerae-suis</u>	6, 7:c:1, 5	Dr. W. Fergunson*
4568-1, 4568-2, 4569-1 4569-2, 83, 98.	C ₂	<u>S. enteritidis</u> ser Newport	6, 8:e, h:1, 2	INCYTAS-DIF.**
02, 010	D ₁	<u>S. typhi</u>	9, 12:d:-	INCYTAS-DIF.**
30, 37, 19, 47	D ₁	<u>S. enteritidis</u> ser Panama	9, 12:l, v:1, 5	INCYTAS-DIF.**
F ₃	E ₁	<u>S. enteritidis</u> ser Shangani	3, 10:d:1, 5	Dr. W. Fergunson*
99, 500, 4573-1, 4573-2	E ₁	<u>S. enteritidis</u> ser Anatum	3, 10:e, h:1, 6	INCYTAS-DIF.**
F ₄	E ₂	<u>S. enteritidis</u> ser Newington	3, 15:e, h:1, 6	Dr. W. Fergunson*
25, 60, 4572-1, 4572-2, 4570-2, 4571	E ₄	<u>S. enteritidis</u> ser Senftenberg	3, 19:g, s, t:-	INCYTAS-DIF.**

* Dr. W. Fergunson, Departamento de Salud del Edo. Michigan, Estados Unidos.

** Instituto Nacional de Ciencias y Tecnología-DIF.

CUADRO 2

ANTICUERPOS CONTENIDOS EN LOS SUEROS SPICER-EDWARDS
(FLAGELARES EN FASE ESPECIFICA)

SUERO No. 1	SUERO No. 2	SUERO No. 3	SUERO No. 4
a; b; c; d; e; e, h; Complejo G; i	a; b; c; d; k; r; y; z ₂₉	a; d; e, h; k; z; Complejo z ₄ ; z ₂₉	b; d; Complejo G; k; z; z ₁₀ ; r

El Complejo G comprende: f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s;
g, m, s, t; g, m, t; g, ps; g, p, u; g(p), z₅;
g, q; g, s, t; g, t; m, p, t, u; m, t.

El Complejo z₄ comprende: z₄, z₂₃; z₄, z₂₄; z₄, z₃₂.

CUADRO 3

REACCIONES BIOQUÍMICAS DE LAS 39 CEPAS DE SALMONELLA ESTUDIADAS

CLAVE DE LA CEPA	1000	29	01	100	110	040	600	07	078	079	50	83	010	02	37	47	19	30	99	500	25	60	4568-1	4568-1	4569-1	4569-1	4570-1*	4570-2	4571-1	4572-2	4573-1	4573-2	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅				
Glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sulfhídrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rojos de matilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Halonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Cepa bioquímicamente aberrante

(+) Producción de ácido y gas.

+ Producción de ácido.

CUADRO 4

FRECUENCIAS ENCONTRADAS ENTRE LA AGLUTINACION EN TUBO
Y LA REACCION DE COAGLUTINACION CON LOS SUEROS DE
SPICER-EDWARDS.

SUEROS SPICER-EDWARDS	No. TOTAL DE REAC. POSITIVAS ESPERADAS DE ACUERDO CON LOS SER ESTUDIADOS	POSITIVAS POR AGLUTINACION EN TUBO (%)	POSITIVAS POR COAGLUTINACION (%)	χ^2_p *	p**
1	35	28(80)	35(100)	7.77	0.01
2	6	4(66)	6(100)	2.40	0.1
3	16	12(75)	16(100)	4.57	0.05
4	13	13(100)	13(100)	0.00	-
L	7	5(71)	6(86)	0.42	0.50
I	26	15(58)	19(73)	1.35	0.20
TOTAL	103	77(74)	95(92)	11.45	0.001

* Prueba de χ^2 de proporciones.

** Probabilidad de diferencia debida al azar.

CUADRO 5

REACCION DE AGLUTINACION EN TUBO Y DE COAGLUTINACION
DE LOS ANTIGENOS FLAGELARES EN FASE ESPECIFICA

SALMONELLA	ANTIGENOS SOMATICOS	ANTIGENOS H	SUEROS POSITIVOS	No. DE CEPAS	AGLUTINACION EN TUBO	COAGLUTINACION
Paratyphi	2, 12	a	1, 2, 3	1	0	1
Arechaveleta	4, 5			1	0	1
Ohio	6, 7	b	1, 2, 4	3	3	3
<u>S. cholerae-suis</u>	6, 7	c	1, 2	1	1	1
<u>S. typhi</u>	9, 12	d	1, 3, 4	2	2	2
Shangani	3, 10			1	1	1
Newport	6, 8	e, h	1, 3	6	6	6
Anatum	3, 10			4	2	4
Newington	3, 15			1	1	1
Senftenberg	3, 19	G	1, 4	7	7	7
Typhimurium	4, 5	i	1	8	5	8
Panama	9, 12	L	1, v	4	3	4
TOTAL				39	31	39

χ^2_p 8.91, DF 1, $p < 0.01$.

CUADRO 6

REACCION DE AGLUTINACION EN TUBO Y DE COAGULACION
DE LOS ANTIGENOS FLAGELARES EN FASE NO ESPECIFICA

SALMONELLA	ANTIGENOS SOMATICOS	COMPLEJOS FLAGELARES POSITIVOS	ANTIGENOS H	No. DE CEPAS	AGLUTINACION EN TUBO	COAGULACION
Arechaveleta	4, 5	l	1, 7	1	0	1
Typhimurium	4, 5	l	1, 2	8	3	6
Ohio	6, 7	L	1, w	3	2	2
<u>S. cholerae-suis</u>	6, 7	l	1, 5	1	0	1
Newport	6, 8	l	1, 2	6	4	4
Panama	9, 12	l	1, 5	4	1	1
Shangani	3, 10	l	1, 5	1	1	1
Newington	3, 15	l	1, 6	3	3	3
TOTAL				29	16*	21*

El complejo L comprende: l, v; l, w; l, z₁₃; l, z₂₈; l, z₂₈; l, z₄₀. Este complejo comprende tanto a la fase específica como a la fase no específica.

El complejo EN comprende: e, n; e, n, x; e, n, z₁₅.

El complejo l comprende: l, 2; l, 5; l, 6; l, 7.

χ^2_p 1.86, Df 1, p > 0.2.

CUADRO 7

REACCION DE COAGLUTINACION DE LOS ANTIGENOS SOMATICOS Y FLAGELARES
CALENTADOS Y SIN CALENTAR

CLAVE DE LA CEPA	ANTIGENO SOMATICO 6, 8 SIN CALENTAR	ANTIGENO SOMATICO 6,8 (100°C X 60')	ANTIGENO FLAGELAR e, h SIN CALENTAR DILUCION 1:8	ANTIGENO FLAGELAR e,h (100°C X 60') DILUCION 1:8
4568-1	4+	4+	4+	Negativo
4568-2	4+	4+	4+	Negativo
4569-1	4+	4+	4+	Negativo
4569-2	4+	4+	4+	Negativo

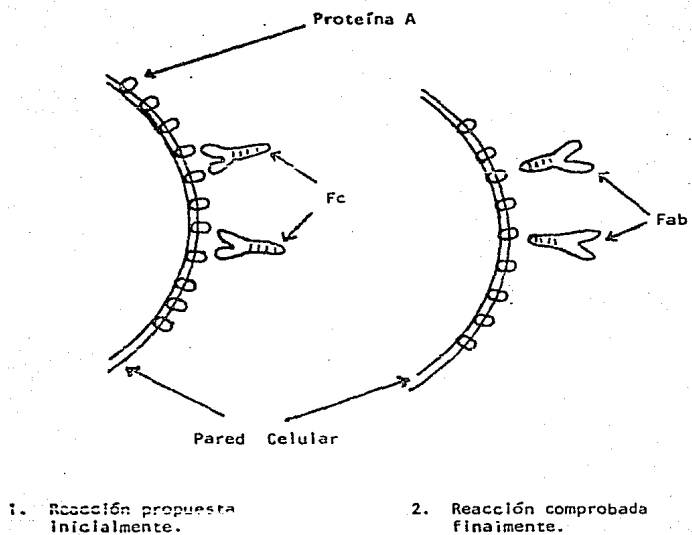


FIG. 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL MECANISMO DE COAGULACION PROPUESTO POR KRONVALL.
ESQUEMA TOMADO DE BRILL¹⁹

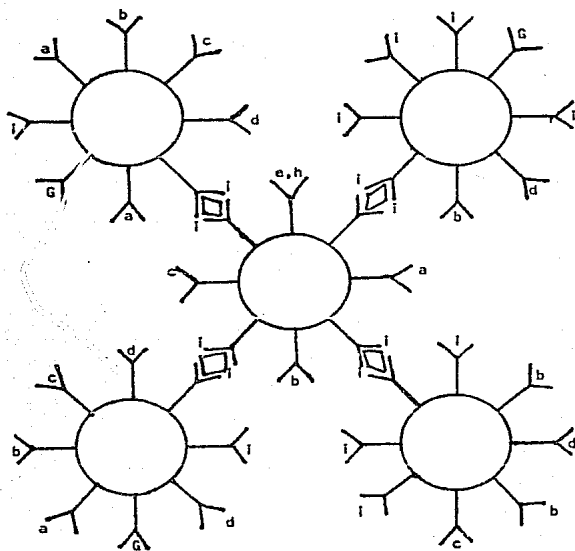
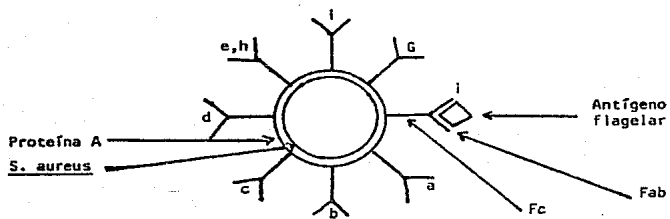


FIG. 2. MECANISMO DE COAGULINACION CON LOS
SUEROS DE SPICER-EDWARDS.