

3
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

1945

CONTRIBUCION
A LA INVESTIGACION Y
CLASIFICACION
SEROLOGICA DE
SALMONELAS EN LECHE

TESIS

PRESENTA

IGNACIO RAUDON GONZALEZ

PARA EXAMEN PROFESIONAL DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



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 esta 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.

A MIS PADRES, FORMADORES
DE MI VIDA

CON MI AGRADECIMIENTO

SUMARIO

- I.—INTRODUCCION.
- II.—MATERIAL DE ESTUDIO.
- III.—METODOS DE TRABAJO.
 - a).—AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.
 - b).—IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS MISMAS.
- IV.—RESULTADOS.
- V.—RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- VI.—BIBLIOGRAFIA.

PARTE PRIMERA

INTRODUCCION

Los trabajos de Hormaeche y colaboradores efectuados en el Uruguay (1, 2, 3, 4), los llevaron a la concepción de la "Doctrina de Montevideo", según la cual "el niño, sobre todo en el primer año de su vida es muy sensible a las salmonelas de origen animal" (5); lo que completando a la clásica "Doctrina de Kiel", o sea "que el hombre adulto es sumamente resistente a las infecciones por las mismas salmonelas" (1), ensaya la interpretación de las diarreas infantiles de acuerdo con los hechos adquiridos en las investigaciones citadas y en otras llevadas a cabo en diferentes países, por numerosos investigadores, como son:

Zozaya y Varela 1932, (6), Smith y Kauffman 1934 (7) Habs en el mismo año (8), Schiff 1938 (9), Schiff y Strauss 1939 (10), Guthrie 1939 (11), Abramson 1939 (12), Pío de Roda en el mismo año (13), Smith y Kauffmann 1940 (14), Varela y Zozaya 1940 (15), Aballí 1941 (16), Bornstein y Schwartz 1942 (18), Brieseño-Iragorri 1942 (17), Varela, Zozaya y Olarte 1942 (19), Varela y Olarte 1943 (20).

Todas ellas han señalado en una forma constante a las salmonelas como agentes causales de "diarreas infantiles". De esto deriva el interés que el pediatra tiene en la actualidad por las salmonelas. La amplia distribución y frecuencia que presentan estos gérmenes sobre todo en la ciudad de México, según se desprende de los trabajos de diversos autores mexicanos, como Varela, Zozaya, Olarte, Téllez Girón, etc. (21 a 30 inc.), constituye un renglón de importancia para el higienista que busca la disminución de la mortalidad infantil mexicana. Esta mortalidad, no obstante que tiende a disminuir, es aún elevada, como se desprende de las estadísticas obtenidas por Bustamante y Aldama en 1939 (31), del que tomamos los siguientes coeficientes:

Coeficiente de mortalidad en menores de un año por mil nacidos vivos en el D. F., 221.47.

El coeficiente de toda la República es mucho menor (149.67 por mil); esta enorme diferencia entre el Distrito Federal y el resto de la República posiblemente se deba a la existencia de zonas, en el Distrito Federal, que presentan una mortalidad aterradora (hasta 400, por mil nacidos vivos), como son la Colonia Buenos Aires y Santa Julia.

En la clasificación de las causas de esta mortalidad, ocupan el primer lugar las "diarreas y enteritis" con un 39.28 por mil. Lo anterior nos indica que un gran nú-

mero de defunciones infantiles son debidas a afecciones del tubo digestivo. Estas afecciones están originadas, principalmente, por dos clases de gérmenes, cuando son de naturaleza infecciosa: salmonelas y *shigellas*. Para sustentar este criterio nos basamos en los ya citados trabajos de Hormaeche y en otros efectuados por Neter en 1942 (32), Weil en 1943 (33), etc.

Según Hormaeche, Bonaba y Carrau, en 1940 (34), hasta un 20.25% de los casos de diarrea infantil presentaban, en su estudio bacteriológico, salmonelas. Unido este dato al de la mortalidad infantil por "diarreas", nos hace deducir un número de defunciones de niños ocasionadas por este género, de bastante importancia.

Si bien es cierto que todos los trabajos citados tienden a aclarar el papel patógeno de las salmonelas de origen animal sobre el hombre (en especial sobre niños pequeños), también es cierto que casi no se conocen datos sobre la epidemiología de estos gérmenes. Por similitud con otros de grupo, ya bien conocidos (bacilos tífico y paratíficos), principalmente se supone que son las vías hídrica y alimenticia las intermediarias de la infección. Pero en realidad, pocos trabajos para comprobar lo anterior, se hallan en la literatura extranjera. Entre éstos tenemos los de Hormaeche en 1939 (5); Lembke en 1941 (35); Bornstein y Schwarz en 1942 (18). En la literatura nacional no hay ninguna comunicación a este respecto.

Lo anterior sugirió la necesidad de explorar este campo para dar al higienista y médico mexicanos datos concretos sobre la vía de contagio salmonelósico.

Este corto trabajo sólo aborda pequeña parte del problema, concretándose al estudio del factor base de la alimentación infantil: la leche. Es ésta, por su constitución y manejo, un fácil vehículo de infecciones de este tipo (36), lo que confirman además, gran número de investigaciones realizadas en este sentido, como son las de Wilson en 1933 (37) quien registró en Inglaterra entre los años de 1912-31, 37 brotes de tifoideas, paratifoideas y gastroenteritis originados por la ingestión de leche que causaron 5,602 defunciones; Armstrong y Parran en 1927 (38), en los Estados Unidos, registraron entre otras causas, 492 brotes epidémicos extendidos por la leche, de tifoidea, paratifoideas y diarreas, con una mortalidad aproximada de 15,400 defunciones. De esos brotes corresponde la mayor incidencia a la *E. typhi*, con 479 brotes, la siguen los *B. paratíficos* con 7 brotes y por último, las diarreas con 6 brotes. Hassler y Williams en 1936 (39), no sólo registraron los brotes epidémicos, sino que hicieron un estudio del origen de la contaminación de la leche, llegando en la mayoría de los casos a la conclusión de que, trabajadores en contacto con la leche, siendo portadores sanos, hicieron la contaminación.

Aun sólo tratándose de la leche, la amplitud del problema, impidió abarcarlo en toda su extensión, es decir, hacer un estudio completo, estadístico y *repetido*, de la presencia y origen de salmonelas en la leche. Se logró solamente hacer una exploración del grado de contaminación de dicho producto alimenticio que se consume en la Ciudad de México, es decir, tener un dato indicador del valor de la leche como vehículo de salmonelas.

Se quiso, además, que este trabajo sirviese como ilustración de los métodos modernos que se siguen en el aislamiento e identificación serológica de este género; puesto que son de utilidad por no ser muy conocidos habiéndose usado sólo en centros especializados hasta la fecha.

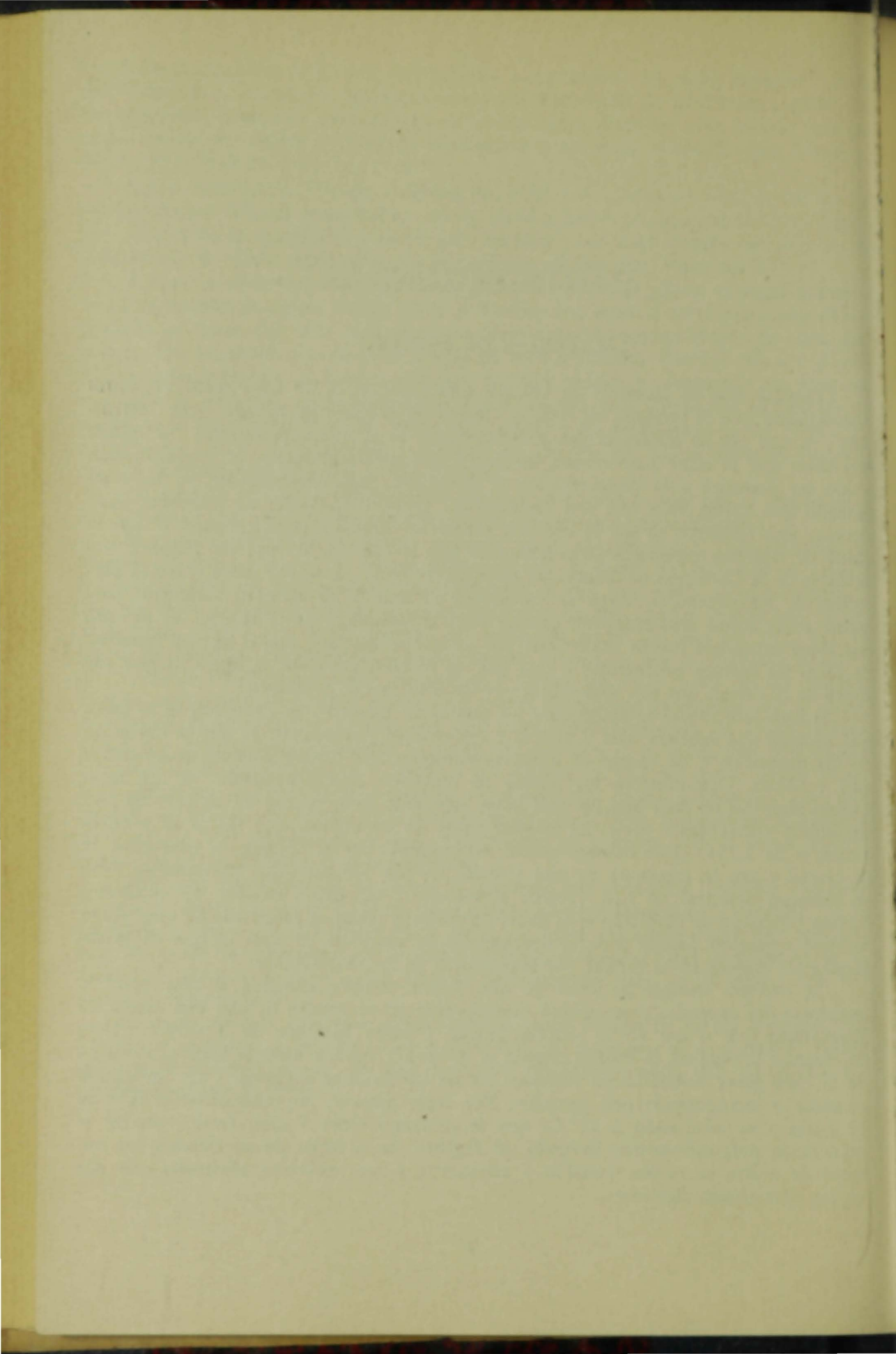
PARTE SEGUNDA

MATERIAL DE ESTUDIO

Consistió éste en muestras de LECHE CERTIFICADA de unos cinco c.c. aproximadamente que se tomaron de toda la Ciudad de México. Se escogió leche "certificada", ya que por su estado, origen y conservación es la más contaminada. No quiere esto decir que la leche pasteurizada no pueda contener salmonelas; la contaminación puede ser posterior a la pasteurización y, de hecho, experimentalmente, se ha comprobado que existe, sino que son menores las probabilidades de su impureza. Para efectuar este muestreo se usó la división oficial de 1944 de demarcaciones, y con la ayuda de registros especiales proporcionados por la Sección Técnica de Higiene Veterinaria de la Dirección de Salubridad en el D. F. (40), se marcó sobre plano la ubicación de los expendios. Estos se escogieron al azar y en número suficiente para cubrir en la forma más completa posible toda la superficie de la ciudad. Se procuró que estos expendios fuesen abastecidos por diferentes establos (para obtener muestras de todas las fuentes productoras), cosa que en muchos casos no se logró ya que hay zonas de la ciudad que son abastecidas por un sólo rancho o establo.

Si bien esta forma de determinar los puntos de muestreo es arbitraria, es la única que se halló que cubriera toda la ciudad y los establos productores, ya que la ubicación de los expendios y su fuente de aprovisionamiento son completamente irregulares y aun variables. Determinados los puntos de muestreo, sistemáticamente se fué recojiendo muestras de cada uno de ellos hasta agotarlos. Estos fueron en número de 563 expendios (una cuarta parte del número total de expendios, que según la relación citada es de 2,254). Este número estuvo determinado por el número de expendios de la ciudad y por la extensión de este trabajo. De los 563 anotados previamente, sólo se tomaron muestras en 520 (véanse Resultados), en virtud de que 43 expendios habían cambiado de domicilio o se habían cerrado; y como el muestrear de otro punto hubiese requerido rehacer toda la distribución de muestras, se optó ya que su localización era regular en la ciudad, por suprimirlos de la investigación.

La muestra siempre se tomó de una botella cerrada, escogida al azar entre la existencia del expendio y se sembró directamente de la botella al tubo con medio de Kauffmann que se usó en la siembra inicial (véanse Métodos de Trabajo). Antes de efectuar la siembra, la botella cerrada se invertía y agitaba hasta la homogeneización de la capa grasa, sembrándose entonces, en las condiciones anotadas 5 c.c. aproximadamente e incorporando por agitación. Por regla general, no transcurrieron más de 12 horas y su incubación a 37° C., que se prolongó hasta 5 días. Estas muestras se numeraron progresivamente, llevando un registro de la fecha de su siembra, su número de orden, su origen (establo y expendio) y los resultados obtenidos con ella en las operaciones siguientes.



PARTE TERCERA

MÉTODOS DE TRABAJO

A.—AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.

Siendo la leche un producto densamente poblado de gérmenes banales propios (36), para el aislamiento de salmonelas (gérmenes de contaminación), se necesitó un medio de cultivo, altamente selectivo y enriquecedor para el género salmonela y a la vez, inhibidor de todos los demás gérmenes que con frecuencia se encuentran en la leche (estreptococo láctico, bacilo láctico, etc.).

Es solamente en los últimos años cuando se han hecho grandes progresos en el estudio de métodos y medios de aislamiento, debido al interés actual de las salmonelas, explicado anteriormente. Entre los medios selectivos que han probado ser más útiles están aquellos que llevan como base caldo simple que contiene bilis, tetracionato de sodio y verde brillante. Müller en 1923, Silverstein en 1929, Schaefer en 1935, Jones en 1936, Kauffmann en 1930-31, Boecker en 1935, Waldhecker en 1935 (36), investigaron varias fórmulas y variantes con mayor o menor éxito. De todos los anteriores y otros muchos trabajos, extranjeros y nacionales (41 a 44), se llegó a la conclusión de que el "Método de Enriquecimiento de Kauffmann", era el que más se adaptaba a la índole de este trabajo. Este método según afirmación de Hormaeche y Surraco en 1941 (44), en sus trabajos les ha rendido un resultado de 3.5: 1, en relación con la siembra directa, proporción que aumenta considerablemente el éxito de la búsqueda.

El método de Kauffmann descrito por su autor en 1930 con el nombre de "Método de Enriquecimiento combinado al tetracionato", consiste en el empleo de un medio líquido para el enriquecimiento de los gérmenes y aislamiento posterior después de incubación de 1 y 5 días en medio de Kristensen en placas. El medio para enriquecimiento es una modificación del original de Müller (45) y admite ser sembrado con cantidades abundantes de material por examinar (hasta 5 c.c. de leche en este caso).

Estos medios, no obstante su utilidad, son de relativa facilidad en su preparación como se desprende de sus fórmulas que se dan a continuación:

"Medio de Enriquecimiento al Tetracionato de Kauffmann" (41).

a) Tetracionato original:

Poner en un recipiente 50 gramos de creta (CaCO_3), y esterilizar al autoclave; agregar 900 c.c. de caldo simple estéril y 100 c.c. de solución esterilizada al auto-

clave de hiposulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), con 500 gramos de hiposulfito para un litro de agua. Añadir 20 c.c. de solución yodo-yodurada (Yodo: 20 gr., yoduro de potasio 25 gr., agua destilada c.b.p. 100 c.c.). Operar asépticamente pues el medio no debe ser calentado.

b) Medio "K":

Para obtenerlo, a 100 c.c. del tetratiónato original, añadir 10 c.c. de solución acuosa de verde brillante al 1% y 50 c.c. de bilis de buey esterilizada. Repartirlo en tubos estériles a razón de 10 c.c. por tubo, agitando continuamente para evitar la sedimentación de la creta. Controlar la esterilidad incubando los tubos en la estufa a 37° C., durante varios días.

"Agar de Kristensen, Lester y Jürgens, modificado por Hormaeche y Surraco" (46, 44).

Para un litro de medio: 10 gr. de peptona Riedel, 5 gr. de extracto de carne Liebig, 5 gr. de cloruro de sodio, 15 gr. de lactosa, 40 c.c. de solución de rojo de fenol; 25 gr. de agar y agua destilada, c.b.p. 1000 c.c.

Fundir al autoclave; llevar a un pH de 7-7.2 y al medio fundido, antes de repartirlo en placas, agregar 1.5 c.c. por litro de solución acuosa de verde brillante de Hoechst al 0.5%. La fórmula de la solución de rojo de fenol es: 1 gr. de rojo de fenol, 40 c.c. de NaOH N/10 y 400 c.c. de agua destilada

En lugar de Peptona Riedel, Hormaeche y Surraco usaron Peptona "Bacto", y verde brillante de "Harleco", con buenos resultados. Además, reducen la proporción de lactosa al 1% y añaden sacarosa en la misma cantidad lo que les permite reconocer en la placa algunas cepas de coli que fermentan la sacarosa, pero no la lactosa, en 24 horas.

En el medio de enriquecimiento de Kauffmann se desarrollan, no sólo salmonelas, sino algunas otras especie como son: proteos, algunos coliformes, bacilo piociánico, alkalígenes, etc.; por lo tanto, es necesario usar para el aislamiento un medio que inhiba a estas bacterias. Esto explica el uso que Kauffmann hace del medio de Kristensen (46), uso que Hormaeche califica de "excelente" después de 4 años de uso constante (42). En este medio, habitualmente no se desarrollan los proteos, o si lo hacen, su crecimiento es muy pobre; todos los cocos y numerosas colonias de coliformes son también inhibidos, pero en cambio el bacilo piociánico se desarrolla fácilmente con la desventaja de que sus colonias son de morfología parecida a la de las salmonelas dando también coloración roja. Existen pequeñas diferencias morfológicas (el piociánico da colonias más planas, de borde desgarrado y brillo metálico), pero estas diferencias no son suficientes para la eliminación de estas colonias. Para evitar esta dificultad se optó por usar para la siembra de aislamiento, además del Kristensen, una placa del clásico medio de Endo (47) que por no tener inhibidores nos permite delatar proteos, piociánicos y otros gérmenes, que en el Kristensen son difíciles de descubrir.

Las placas se incubaron a 37° C., durante 24 horas, al cabo de las cuales se aislaron las colonias más típicas, no fermentadoras de la lactosa (pequeñas, circulares, bordes netos, blancas y brillantes). De estos desarrollos de aislamiento, sistemáticamente se hicieron reaislamientos sobre medio de Endo, ya que de no hacerlo así, ocurre a menudo que aunque las colonias de salmonelas estén aisladas y aparentemente puras, los cultivos obtenidos de ellas están contaminados, pues algunas especies (principalmente proteos), aunque inhibidas, se mantienen vivas y desarrollan en los cultivos subsiguientes (42) Algunas ocasiones hubo necesidad de hacer varios reaislamientos antes de estar seguros de la pureza de la cepa.

En estas condiciones, los cultivos se sometieron a un corto estudio bioquímico orientador que consistió en conocer la acción de cada cepa por incubación a 37° C., por 24 horas, sobre la glucosa, lactosa, sacarosa y las producciones de indol y ácido sulfhídrico, propiedades todas que son parte de la definición del género (véase Identificación).

Para estas identificaciones se escogieron, entre un gran número de medios y reacciones especiales para dichas pruebas, los siguientes:

Para glucosa, lactosa y H₂S, siembra en medio de Kligler (48), que no es sino el medio de Russell adicionado de acetato de plomo para la búsqueda de ácido sulfhídrico. Su fórmula es:

1. Preparación de gelosa simple con extracto de carne en la forma conocida.
2. Ajustar el pH entre 7.4 y 7 con indicador de Andrade.
3. Añadir 1% del volumen de indicador de Andrade.
4. Repartir 5 c.c. por tubo y esterilizar.
5. Preparar una solución con 20% de lactosa y 20% de glucosa y esterilizar.
6. Añadir 0.25 de c.c. de la solución estéril Núm. 5 a cada tubo de agar fundido Núm. 4 y enfriado a 60° C.
7. Preparar y esterilizar una solución al 0.25% de acetato básico de plomo y añadir 1 c.c. a la gelosa Núm. 4.
8. Inclinar dejando bloque y superficie.

Según el autor, en su medio el bacilo coli enrojece todo el tubo y da gases. El bacilo tífico enrojece el piquete, su estría es incolora y vira a café cerca del piquete. Los bacilos disentéricos y pseudodisentéricos, enrojecen el piquete, pero no dan gases ni sulfhídrico. El bacilo paratífico A, da gases en el piquete, estría incolora y no da sulfhídrico. El bacilo paratífico B fermenta igual que el A, pero sí da sulfhídrico.

En la práctica, se usó el medio de Kligler preparado por la casa Difco bajo la forma de polvo que basta poner en agua y esterilizar para tener el medio original.

Para buscar el indol se usó agua con triptofano al 1% ("Bactotryptane") y el reactivo de Ehrlich. Se añade un c.c. de éter al cultivo de 24 horas, el cual se agita, se deja separar la capa etérea y se añade un c.c. del reactivo —paradimetil-aminobenzaldehído, 4 gr.; alcohol etílico de 96°, 380 gr.; ácido clorhídrico concentrado, 80 gr. (36)—; se estratifica y una reacción positiva dará un anillo de color que va desde el rosa hasta el púrpura intenso en un lapso de más o menos un minuto.

Para la sacarosa se usó gelosa sacarosada al 1% con indicador de Andrade al 3% puesta en el bloque y sembrada por piquete profundo. La observación de estos tubos se prolongó en este caso hasta 15 días por gérmenes fermentadores lentos de la sacarosa.

Se seleccionaron como sospechosas aquellas cepas que no fermentaron la lactosa ni la sacarosa, ni dieron indol; pero que fermentaron con producción de ácido o de gas, la glucosa, y produjeron o no ácido sulfhídrico. Todas las demás se desecharon, a excepción de aquellas que, fermentando la glucosa, no fermentando la lactosa ni la sacarosa, dieron indol y no sulfhídrico, como posibles *Salmonellas eastbourne* (véanse Métodos Serológicos y Definición del Género). Estas posibles salmonelas se pasaron por una aglutinación que podríamos llamar eliminatória, con un suero "coctel" (15), preparado según las técnicas de Bruce y White (51), que contiene todos los anticuerpos de los antígenos constituyentes del esquema diagnóstico de Kauffmann-White, y que por consiguiente permiten saber si el cultivo problema tiene o no antígenos del género, según la aglutinación con este suero polivalente. Este

siero "mezcla" probó ser muy útil (15), pues ahorra grandes cantidades de sueros tipos puros cuya preparación es larga y laboriosa, al evitar aglutinar con ellos cepas que sin ser salmonelas poseen morfología de colonias y propiedades bioquímicas que se prestan a confusión como son los disintéricos, algunos coliformes, etc.

La aglutinación fué rápida (tipo Huddleson); se hizo en lámina y aunque haya sido muy ligera dicha cepa pasó al estudio serológico que a continuación explicamos.

B.—IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LOS CULTIVOS DE SALMONELAS.

Poco después del aislamiento de la Salmonela suipestifer, por Salmon y Smith en 1885 (49), los bacilos paratíficos fueron encontrados por numerosos investigadores en una gran variedad de padecimientos de animales y en las fiebres entéricas y gastro-entericas del hombre. El aislamiento de organismos similares de fuentes tan diversas, llevó inevitablemente a la confusión. Smith y Stewart en 1897 (50) establecieron que los bacilos "pertenecen a un grupo o especie en virtud de la identidad de su morfología y sus caracteres biológicos". Esta definición resume todos los conocimientos que sobre salmonelas y sus relaciones entre sí, se tenían hasta antes de White en 1926 (51), quien reconoció la importancia de considerar las variaciones bacterianas en relación con el análisis antigénico de las salmonelas. El primer trabajo de White fué confirmado y ampliado por Kauffmann en 1941 (46), dándonos una base rápida y exacta para identificación de cultivos de salmonelas.

Es difícil dar una definición del género salmonela. La definición clásica incluye a aquellos organismos que fermentan la glucosa (usualmente con producción de gases), que no fermentan la lactosa o la sacarosa, y que no producen indol o licúan la gelatina. Esto es suficientemente amplio para incluir a todas las salmonelas, prácticamente. Algunos cultivos, sin embargo, no están de acuerdo con esta definición, y no obstante esto, sus orígenes, sus propiedades patógenas y sus atributos antigénicos los hacen verdaderas salmonelas.

Probablemente la mejor definición del género es la propuesta por el Subcomité de Salmonelosis de la Asociación Internacional de Microbiologistas, en 1940 (52), la cual corrige la definición de White (53) como sigue: "Un gran género relacionado serológicamente; bacilos Gram-negativos, no esporulados, de 0.4 a 0.6 micras de ancho por una a tres de largo (dimensiones usuales), pero formando ocasionalmente filamentos cortos en cultivos viejos; mostrando, con algunas excepciones, una fase normal móvil y peritrica; tomando como tipo al bacilo tífico en lo que respecta a coloración y morfología. No fermentan la sacarosa ni coagulan la leche y raramente fermentan la lactosa, licúan la gelatina o dan indol; regularmente atacan la glucosa con producción de gases, pero pueden faltar éstos. Todas las especies conocidas son patógenas al hombre, a los animales o a ambos".

Mientras que esta definición permite la inclusión en el género de formas que fermentan la lactosa, licúan la gelatina y dan indol, se debe recordar que dichas formas son extremadamente raras y que cualquier cultivo que fermente la lactosa, la sacarosa, forme indol o licúe la gelatina, debe excluirse del género hasta que el análisis antigénico pruebe que es salmonela. En el examen de aproximadamente cuatro mil salmonelas, Edwards y Bruner en 1942 (54), no hallaron una sola cepa con esas propiedades; de lo anterior se desprende que son muy raras. Sin embargo, la *S. dar-es-salaam*, la *S. abortus bovis*, y la *S. schleissheim* licúan la gelatina. Algunas cepas de salmonela eastbourne dan indol. Kauffmann en 1937 (55) descubrió una variante de la *S. anatum* que fermenta la lactosa.

Variación H-O.

Para determinar las propiedades antigénicas de los cultivos de salmonela, es necesario considerar los fenómenos de variación a que estos bacilos se hayan sujetos. Entre ellos está la variación H-O, de Weil y Félix (56), quienes investigaron los antígenos termoestables y termolábiles y sus relaciones al soma y flagelos del bacilo.

Como resultado de su investigación y de estudios similares de otros investigadores resultó una gradual aceptación de que los gérmenes móviles tenían dos tipos de antígenos, que diferían en sus propiedades físicas; cada uno de los cuales estimulaba "in vivo" la producción de sus anticuerpos particulares con los que reaccionaba exclusivamente. Uno de ellos, el antígeno H, está asociado con los flagelos y no se halla en los organismos inmóviles. Es termolábil y se inactiva progresivamente a temperaturas superiores a 60° C. Después de exponerlo a 100° C. por 30 minutos, sus propiedades aglutinogénicas son nulas. Es inactivado por los ácidos y por el alcohol. Los antígenos H, cuando se ponen en contacto con sus correspondientes aglutininas, son floculados rápidamente en copos grandes, fofos, que se dispersan fácilmente.

Los antígenos O, o antígenos somáticos están presentes en bacilos móviles o inmóviles, y son resistentes a un prolongado calentamiento a 100° C. y al tratamiento con alcohol y ácido diluido. Cuando se ponen en contacto con sus correspondientes aglutininas, los antígenos O puros (aquellos preparados con bacilos inmóviles o de bacilos móviles tratados con alcohol o con calor), se aglutinan mucho más lentamente que los antígenos H y forman flóculos finos, granulares que se dispersan con dificultad.

En el examen serológico de los cultivos de salmonelas es absolutamente indispensable distinguir los antígenos O y H, y la acción de sus correspondientes aglutininas.

Variación S-R

Arkwright en 1921 (57) notó primeramente que ciertos cultivos bacterianos, en especial del grupo coli-tífico, llevan a cabo cambios en la morfología de sus colonias, asociados con cambios que afectan el desarrollo en caldo y con alteraciones en la estabilidad de sus suspensiones salinas. Estos cambios fueron vistos como un proceso degenerativo y se llamaron "rugosidad", ya que las colonias de las razas cambiadas poseían superficies rugosas y bordes irregulares. La condición original de los cultivos se llamó liso o "S" (smooth); y los cultivos cambiados, estado rugoso o "R" (rough). Los cultivos R tienen tendencia a formar un crecimiento granular en caldo y las suspensiones salinas preparadas con los cultivos R son mucho menos estables que aquellas preparadas con razas S. Se reconoció que las propiedades serológicas de los antígenos O de las cepas rugosas no son las mismas que aquellas de los cultivos lisos de los que derivan.

Schuetze en 1921 (58), encontró que los cultivos R tienen tendencia a dar aglutinaciones cruzadas; esta relación fué expresada por Schuetze "como el cosmopolitanismo serológico de las variantes rugosas". Debe reconocerse que el cambio de liso a rugoso es un proceso gradual y que existen etapas diferentes de rugosidad, mientras que generalmente, la formación de colonias cambiadas, la estabilidad en caldo y las características serológicas cambiadas van mano a mano, muchos cultivos producen colonias que son bien rugosas en su apariencia pero que son estables en caldo y retienen la mayor parte de su complejo antigénico O. Los antígenos O de

cultivos que tienen una tendencia marcada a un crecimiento granular en caldo, son muy raras veces reconocibles aun a través de algún cambio. Por el contrario, los antígenos de otros cultivos, los cuales producen colonias que parecen no ser anormales y que no tienen tendencias al crecimiento granular en caldo, pueden cambiarse tanto que resulta imposible su identificación. Por consiguiente, la morfología de colonias no es siempre un indicador exacto de la composición antigénica. Pampana (59), halló que la tripaflavina en dilución al 1 por 500 en solución salina normal, puede usarse para indicar la "rugosidad" de las colonias de salmonela. Una gota de suspensión espesa de bacilos en suero fisiológico se mezcla con una gota de tripaflavina en una placa y se hace rotar. Los cultivos rugosos se aglutinan muy rápidamente por el colorante; los cultivos lisos no se afectan. En la experiencia de Edwards y Bruner (54), la prueba de la tripaflavina sigue más exactamente el comportamiento serológico de los antígenos S y R, que como lo hacen cualesquiera otros de los indicadores de rugosidad; sin embargo, ya Kauffmann en 1941 (46), había asentado que los métodos serológicos son los más exactos. Es obvio decir que sólo las razas lisas deben usarse para preparar sueros O, ya que los sueros derivados de los bacilos rugosos tendrán tendencia a aglutinar todos los cultivos sin importarles su identidad. Antígenos satisfactorios para pruebas de aglutinación pueden ser preparados, a veces, de bacilos rugosos siguiendo el método de White (51), quien suspendió cultivos de bacilos en alcohol absoluto, los calentó a 60° C. durante una hora, sedimentó los bacilos por centrifugación y los resuspendió en suero fisiológico. En esta forma pueden obtenerse a veces soluciones estables para pruebas de aglutinación, cuando las soluciones salinas normales con los bacilos, muestran aglutinación. Suspensiones tratadas en esta forma reaccionan en grado mayor o menor con sueros preparados con razas lisas; así, los antígenos O de la cepa rugosa son posibles de identificación. En otros casos, los antígenos así preparados reaccionan sólo con sueros derivados de las razas rugosas, siendo en este caso imposible la identificación de los antígenos O de dichos cultivos.

Variación V-W

Hace mucho se notó que cultivos recientemente aislados de bacilos típicos parecen ser inaglutinables con sueros O. La razón de esto fué desconocida hasta que Félix y Pitt, en 1934 (60), demostraron que los cultivos O inaglutinables tenían un antígeno especial que ellos llamaron antígeno de la virulencia o antígeno "Vi". Encontraron que los cultivos que poseían este antígeno eran más virulentos para el ratón que los que carecían de él; además, los ratones no eran protegidos contra cultivo Vi por vacunación con cepas O. Sin embargo, la vacunación con cepas Vi, daba una alta resistencia para los bacilos Vi. Este antígeno, similar al antígeno H, era inactivado por el calor y por los ácidos. No obstante, en las investigaciones de Peluffo en 1941 (61), resultó inactivado por el alcohol absoluto. Felix y Pitt, también hallaron que cultivos mantenidos en la manera usual, rápidamente perdían el antígeno Vi y se volvían a la forma O aglutinable. Craigie y Brandom (62) y Giovanardi (63), notaron que las colonias que contenían antígeno Vi diferían ligeramente de morfología de aquellas en que faltaba. Las colonias Vi eran ligeramente más opacas y por la luz reflejada representaban el aspecto de vidrio esmerilado; Kauffmann en 1935 (64) llamó a aquellas colonias que contenían antígeno Vi, colonias V y a aquellas que no lo tenían contenían colonias W. Las colonias V son aglutinadas por el suero Vi puro, pero no por el suero O puro, mientras que las colonias W son aglutinadas por el suero O pero también por el suero Vi puro. También halló que en pases sucesivos, cada forma

daba origen a la otra, y llamó a esta variación "V-W". Más aún, Kauffmann (64 y 46), encontró el antígeno Vi en la *S. paratyphi C.* y en ciertos cultivos de *E. coli.* Kauffmann y Moller (65), describieron un nuevo tipo de salmonela con antígeno Vi que llamaron *S. ballerup.* Aparentemente la variación V-W es un fenómeno más ampliamente distribuido en las salmonelas que lo que originalmente se creía.

Variación de forma

Ciertos antígenos O menores, del género, se sobreponen; esto se presenta en más de uno de los grupos mayores en los cuales los bacilos se dividen de acuerdo con sus antígenos somáticos. Entre ellos están los antígenos I y XII. Kauffmann (65, 66) encontró que cuando cierto tipo que contiene antígeno I era sembrado a modo de obtener colonias aisladas, algunas de éstas, contenían grandes cantidades de I (aglutinación intensa), mientras que otras contenían pequeñas cantidades de I (aglutinación ligera). Cada forma daba origen a la otra siendo gradual el cambio. En forma similar el antígeno XII se encontró que era variable y ciertas colonias contenían mayores cantidades de XII que otras. Aquí, la situación era más complicada que con el antígeno I, ya que Kauffmann subdividió el antígeno XII en XII', XII" y XIII"', y halló que sólo el XII" era variable. El tipo de variación de estos antígenos es lo que se llama variación de forma.

Puede recordarse que, las variaciones S-R, V-W y de forma afectan solamente los antígenos somáticos de los bacilos y las reacciones con sueros O. No tienen efecto sobre los antígenos H, excepto que la rugosidad afecta la estabilidad de las suspensiones bacterianas y, por consiguiente, su aglutinación.

Variación de fase

En tanto que los cambios anteriores afectan sólo a los antígenos somáticos, la variación de fase afecta solamente a los antígenos flagelares. Más aún, la variación de fase se presenta únicamente en las cepas móviles de salmonela y no presenta en ningún otro germen conocido. Por muchos años, se ha reconocido que numerosos cultivos de salmonela contenían factores antigénicos específicos y no específicos. Los antígenos no específicos de los tipos diferentes son similares y causan las aglutinaciones cruzadas de grupo en tan altas diluciones que son causa muy frecuente de error. De la absorción de aglutininas dependía el establecer la identidad de varios tipos que entonces se conocía, y mientras que este método era muy exacto no es menos cierto que era muy lento y laborioso. Estaba también sujeto a error en su uso ya que los antígenos estaban considerados como totales y no se hacían ensayos para diferenciar entre antígenos H y O. El trabajo clásico de Andrewes (67, 68), sobre la variación de fase explicó muchas observaciones curiosas concernientes a la variabilidad de las salmonelas y junto con las observaciones de Weil y Felix sobre la variación H-O, sirvieron de fundamento para el trabajo de White sobre la "Clasificación por el Análisis Antigénico".

Andrewes halló que si dos tipos de salmonela con antígenos H similares se sembraban en placa, ciertas colonias eran aglutinadas por sueros derivados de ambos tipos mientras que otras colonias eran aglutinadas por el suero derivado del tipo homólogo, exclusivamente. Pasos subsecuentes derivados de las dos colonias tenían una tendencia marcada a retener esas propiedades, pero eventualmente se volvían a los caracteres mixtos del cultivo total del cual las colonias derivaban.

Los organismos que eran aglutinados sólo por el suero homólogo, se llamaron "fase específica", mientras que las colonias que fueran aglutinadas por ambos sueros, homólogo y heterólogo" estaban en "fase inespecífica". Las colonias de las dos fases eran idénticas en apariencia y caracteres físicos y diferían solamente en su comportamiento serológico. Como ilustración del comportamiento serológico de las fases específica y no específica, con sueros de tipos homólogos y heterólogos, se da la tabla siguiente tomada de Edwards y Bruner (54):

TABLA 1
AGLUTINACION DE FASES ESPECIFICA Y NO ESPECIFICA CON SUEROS
HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS

(CIFRAS DE DILUCION MAXIMA EN LAS QUE SE PRESENTO AGLUTINACION)

ANTIGENOS	S U E R O S	
	S. paratyphi B.	S. typhimurium
S. paratyphi B, Fase esp.	10,000	menos de 100
S. paratyphi B, Fase no esp.	10,000	5,000
S. typhimurium, Fase esp.	menos de 100	10,000
S. typhimurium, Fase no esp.	5,000	10,000

Los sueros usados en estas reacciones fueron preparados de cultivo total de bacilos sin selección. Por consiguiente, contenían aglutininas para las dos fases del cultivo del cual derivaban. Posteriormente fué demostrado que las fases específicas tenían trazas de componentes no específicos y viceversa. Sueros preparados de fases específicas aglutinaban los tipos homólogos en alta dilución, pero tenían títulos muy bajos para los tipos heterólogos. Sueros derivados de fases no específicas aglutinaban a ambos tipos, homólogos y heterólogos a alta dilución.

Cuando se estudiaron mayor número de tipos, se hizo aparente que las fases específicas de Andrewes no sólo eran específicas para un tipo, sino que podían estar en otros tipos bajo las mismas características y en combinación con diferentes antígenos O, o diferentes antígenos no específicos. Por esta razón el Subcomité de Salmonelosis en 1940 (52), substituyó la designación de fase específica y no específica por fase 1 y fase 2, respectivamente. Este cambio aclaró algo la confusión existente, aumentada aún porque Kauffmann y Mitsui en 1930 (69) descubrieron otra forma de la variación de fase a la cual llamaron variación de fase alfa-beta. Esta variación no era una forma diferente de la variación de Andrewes, excepto que los antígenos encontrados en la fase 2 no estaban relacionados a los antígenos no específicos de Andrewes, sino que formaban un grupo aglutinante peculiar. Edwards y Bruner en 1938 (70), describieron una variación de fase en la cual los antígenos de ambas fases son aquellos que generalmente se hallan en la fase 1 de un cierto número de tipos de salmonela.

En el análisis antigénico los antígenos principales llevan símbolos y el mismo antígeno es siempre designado con el mismo símbolo aunque aparezca en varias salmonelas diferentes. No se ha tratado de delinear los antígenos completos de los tipos,

sino solamente aquellos antígenos que tienen importancia de diagnóstico. Los antígenos somáticos del bacilo están indicados por números romanos; los antígenos de la fase 1 por letras latinas minúsculas y los antígenos de la fase 2 por números arábigos. Las fases de Kauffmann y Mitsui son caracterizadas como los antígenos de fase 1 por latinas minúsculas no obstante que representen la fase 2 del bacilo. Esta situación anómala se debe al hecho de que las fases beta (por ej. e,n...) están relacionadas antigénicamente a ciertos antígenos hallados en la fase 1 (e,h...) y no fué sino después que el esquema de diagnóstico, que describiremos después, quedó establecido cuando organismos conteniendo antígenos e,n... se les conoció variación de fase. Primeramente se pensó que eran monofásicos, y una vez que la variación de fase se les demostró, la designación de los antígenos permaneció la misma. Para ilustrar claramente la aplicación de símbolos a los antígenos se da la tabla 2, a continuación:

TABLA 2
FORMULAS ANTIGENICAS

TIPO	Antígenos O	ANTIGENOS H.	
		Fase 1	Fase 2
S. paratyphi B.	IV,V...	b	1,2...
S. abortus bovis.	I,IV...	b	e,n...
S. san diego.	IV,V...	e,h	e,n...
S. saint paul.	I,IV,V...	e,h	1,2...

Se puede ver, por ejemplo, que la fórmula antigénica de la S. paratyphi B es: IV,V: b-1,2..., y que los antígenos en fase 1 son IV,V: b, en tanto que los de fase 2 son IV,V: 1,2...

No todos los tipos de salmonela son difásicos; muchos son monofásicos y en ellos todas las colonias contienen idénticos antígenos H. Este estado monofásico es característico de la S. enteritidis (IX, XII: g,m...) y todos los otros tipos que contienen antígenos "g" o "m". Ciertas otras especies son también monofásicas, pero en caso de que se encuentre una sola fase que no contenga "g" o "m", es absolutamente necesario confirmar con certeza que la otra fase no ha sido suprimida temporalmente como sucede a veces en cultivos recientes aislados de colonias únicas. Los métodos para aislamiento de fases suprimidas se explicarán en detalle más adelante.

Análisis antigénico

Antígenos Somáticos del Genero Salmonela.

En el examen serológico de cultivos de salmonela, los antígenos somáticos son los que se identifican primero. Esto se hace usando los sueros puros O, que representan los varios antígenos termoestables del grupo. Por el uso de los sueros de la tabla 3,

TABLA 3

SUEROS USADOS PARA IDENTIFICAR ANTIGENOS "O"

Sueros números	Aglutininas	Cultivos usados en la preparación
O 1	I,II,XII	<i>S. paratyphi A</i>
O 2	IV,V,XII	<i>S. typhi-murium</i>
O 3	IV,XXVII,XII	<i>S. scheleissheim</i>
O 4	VI,VII	<i>S. oranienburg</i>
O 5	VI,VIII	<i>S. newport</i>
O 6	IX,XII	<i>S. gallinarum</i>
O 7	III,X,XXVI	<i>S. anatum</i>
O 8	III,XV	<i>S. newington</i>
O 9	I,III,XIX	<i>S. senftenberg</i>
O10	XI	<i>S. aberdeen</i>
O11	XIII,XXII	<i>S. poona</i>
O12	I,XIII,XXIII	<i>S. worthington</i>
O13	VI,XIV,XXIV	<i>S. carrau</i>
O14	(I),VI,XIV,XXV	<i>S. onderstepoort</i>
O15	XVI	<i>S. gaminara</i>
O16	XVII	<i>S. kirkee</i>
O17	XVIII	<i>S. cerro</i>
O18	(VIII),XX	<i>S. kentucky</i>
O19	XXI,XXVI	<i>S. minnesota</i>
O20	XXVIII	<i>S. tel-aviv</i>
O21	XXIX	<i>S. ballerup forma W</i>
O22	XXX	<i>S. urbana</i>
O23	VI	<i>S. ballerup forma V</i>

en su examen, de los antígenos O de todos los tipos de salmonela conocidos hasta 1944, se pueden identificar. Los sueros que se usaron en el presente trabajo fueron proporcionados por el Prof. Kauffmann del Centro Internacional de Salmonelas de Copenhague al Centro Mexicano de Salmonelosis; únicamente como dato ilustrativo damos la técnica para la preparación de los mismos. Para preparar dichos sueros Kauffmann siguió las técnicas de Bruce-White (51), los cuales para preparar sueros que contengan sólo aglutininas para los antígenos somáticos, necesitan inactivar los antígenos flagelares. Esto se lleva a cabo por calentamiento del cultivo en caldo en un baño de agua hirviente, por dos horas. Después que los cultivos en caldo son calentados se preservan con 0.3% de formol. Se aplica a los conejos cuatro inyecciones intravenosas de los bacilos hervidos con intervalos de cuatro días. Las cantidades dadas usualmente son de 0.5, 1, 2 y 3 c.c. Cuatro inyecciones, por regla general, dan un suero con buen título; pero si en la sangría de prueba el título es bajo, se puede aplicar una quinta inyección de 3 c.c. Los conejos se sangran al 5º ó 6º día después de la última inyección y los sueros se preservan añadiéndoles igual volumen de glicerina.

Preparación del suero Vi

Para preparar este suero se necesita un cultivo que esté en forma V. Cualquier bacilo que contenga antígeno Vi puede usarse para la preparación de este suero. Para

TABLA 4

SUEROS USADOS PARA IDENTIFICAR ANTIGENOS "H"

Sueros números	Aglutininas	Cultivos usados en la preparación
H 1.....	a	S. paratyphi A
H 2.....	b	S. paratyphi B, fase 1
H 3.....	c	S. cholerae-suis, fase 1
H 4.....	d	S. typhi
H 5.....	e,h	S. reading, fase 1
H 6.....	e,n,x...	S. abortus-equi
H 7.....	e,n,z ₁₅ ...	S. glostrup, fase 2
H 8.....	f,g...	S. derby
H 9.....	g,m...	S. enteritidis
H10.....	g,m,s...	S. montevideo
H11.....	g,p...	S. dublin
H12.....	g,p,u...	S. rostock
H13.....	g,p...	S. moscow
H14.....	g,s,t...	S. senftenberg
H15.....	i	S. bonariensis, fase 1
H16.....	k	S. thompson, fase 1
H17.....	l,v...	S. bredeney, fase 1
H18.....	l,w...	S. worthington, fase 1
H19.....	l,z ₁₃	S. uganda, fase 1
H20.....	l,z ₂₈	S. javiana, fase 1
H21.....	m,t...	S. oranienburg
H22.....	r	S. rubislaw, fase 1
H23.....	y	S. mikawashima, fase 1
H24.....	z...	S. poona, fase 1
H25.....	Z ₄ Z ₂₃ ...	S. cerro
H26.....	Z ₄ Z ₂₄ ...	S. duesseldorf
H27.....	Z ₆	S. kentucky, fase 2
H28.....	Z ₁₀	S. illinois, fase 1
H29.....	Z ₁₄	S. ballerup
H30.....	Z ₂₇	S. simsbury
H31.....	Z ₂₉	S. tennessee
H32.....	1,2...	S. paratyphi B, fase 2
H33.....	1,2,3...	S. newport, fase 2
H34.....	1,5...	S. cholerae-suis, fase 2
H35.....	1,6...	S. anatum, fase 2
H36.....	1,7...	S. gaminara, fase 2

procurarse un cultivo Vi puro, la siembra de la cepa se hace en placa varias veces, tomando las colonias V únicamente hasta que en la placa no aparezcan colonias W. Cultivos vivos en caldo, de la forma V, se pueden usar para preparar el suero; pero cuando se han usado cepas móviles, el suero resulta también con un alto título de aglutininas H que son muy difíciles de absorber para dejar el suero Vi puro. Desde que Peluffo en 1941 (61), mostró que el antígeno Vi no es inactivado con el tratamiento por alcohol absoluto, se puede preparar un antígeno para la producción de suero Vi raspando un cultivo V puro de una placa de agar y suspendiendo los bacilos en alcohol absoluto, deshidratando posteriormente a vacío. Este tratamiento inactiva casi por completo los antígenos H. Los bacilos secos se muelen hasta dar un polvo que puede conservarse en tubo cerrado y bajo estas condiciones el antígeno Vi es estable y el polvo puede guardarse sin ninguna deterioración. Se suspende en suero fisiológico.

gico antes de la inyección intravenosa. Los conejos resisten perfectamente las inyecciones, y pueden administrárseles grandes cantidades.

Uso de los Sueros "O".—Los sueros O se usaron en aglutinación en lámina para identificar los antígenos termoestables de los cultivos problema. Los antígenos para estas pruebas se prepararon simplemente del cultivo de una gelosa inclinada emulsionado en 1.5 c.c. de suero fisiológico a formar una emulsión homogénea y densa. Otro método es el de White (51) en el cual el desarrollo de un tubo se suspende en 1 c.c. de alcohol absoluto y se calienta a 60° C. por una hora. Los gérmenes se sedimentan por centrifugación, el alcohol se decanta y los bacilos se resuspenden en 0.5 c.c. de solución salina fisiológica. Este método es particularmente útil en el examen de cultivos que son ligeramente rugosos. Edwards y Bruner (54), han usado este método satisfactoriamente para el examen rutinario de salmonelas. Es de advertir que los organismos tratados por el alcohol se tornan algo más resistentes a la aglutinación en lámina y los sueros deben usarse en diluciones menores a las usuales. Si los gérmenes se suspenden en suero fisiológico sin tratarlos por el alcohol, no debe usarse suero fisiológico fenolado, porque el fenol inhibe la aglutinación somática en presencia de antígenos flagelares.

Los sueros glicerizados se diluyen con suero fisiológico; la dilución generalmente usada depende del título individual de cada suero. Cada suero debe ser titulado con su antígeno homólogo y usado en la dilución más alta a la que dé una aglutinación fuerte en lámina entre 30 segundos y un minuto. Si los sueros se usan a diluciones menores las reacciones de aglutinación cruzada pueden confundir los resultados. En las pruebas el antígeno se pone abajo en la lámina, en gota pequeña, más o menos 0.01 c.c.; una gota de igual volumen se pone sobre el antígeno, de cada suero diluido y se mezclan por rotación de la lámina hasta hacer aparente la aglutinación. Esta se llevo a cabo con uno o más de los sueros que contengan aglutininas para los antígenos somáticos que tiene el organismo que se examina.

Una aglutinación cruzada muy marcada se presenta entre tipos que contengan antígenos O relacionados; por ejemplo, un bacilo que tiene los antígenos IV, V, XII, será aglutinado no sólo por el suero derivado de un organismo con antígenos somáticos idénticos, sino también por un suero que contenga aglutininas para los antígenos IV, XXVII, XII, por ejemplo, ya que los antígenos IV y XII son comunes a los dos tipos. Por esta razón es necesario recurrir al uso de sueros absorbidos para determinar cuando un cultivo desconocido contiene ciertos antígenos presentes en otros tipos.

Técnica de la absorción de aglutininas.

El antígeno para la absorción de aglutininas se obtiene sembrando abundantemente una placa de agar con unas 0.3 de c.c. de cultivo en caldo de 24 horas. Las placas se incuban durante 24 horas y el cultivo resultante se recoge con suero fisiológico, en cantidad suficiente para que el volumen de la suspensión bacteriana sea de más o menos 1 c.c. por placa. Esta suspensión se añade de suero aglutinante en cantidad suficiente para retirar todas las aglutininas con la cepa absorbente. Para hacer una absorción "única", la mezcla suero-antígeno se pone en baño maría a 50° C. por dos horas y los bacilos absorbentes se remueven por centrifugación. Si las aglutininas por absorber están en grandes cantidades, es más fácil removerlas en dos pasos. Cuando un suero se absorbe en dos partes (doble absorción), la cantidad de suero se añade a un medio de la suspensión absorbente; la mezcla se incuba a 50° C. durante una hora y los

bacilos se centrifugan. El suero sobrenadante diluido se retira y se mezcla con el otro medio de la suspensión absorbente; se incuba nuevamente a 50° C. durante una hora y se centrifuga. El suero absorbido se conserva añadiéndole un poco de cloroformo.

Es obvio decir que en la técnica anterior, las diluciones que resultan en el suero son solamente aproximadas, ya que es imposible calcular el volumen ocupado por los bacilos suspendidos y por consiguiente, hacer diluciones exactas.

Además, como el análisis antigénico es cualitativo y no cuantitativo las inexactitudes de las diluciones son de poca importancia.

Determinación de factores somáticos únicos.

Los métodos para determinar los antígenos O, únicos, que tienen significado de diagnóstico, se llevan a cabo con sueros puros de un sólo factor aglutinante. La preparación de estos sueros se basa en la absorción de aglutininas por el método clásico de Castellani y su descripción es, en síntesis, la dada anteriormente. Como ejemplo, únicamente damos la preparación de dos de estos sueros.

Suero factor V. Un suero IV, V, XII es absorbido por *S. typhimurium* var. Copenhagen (IV, XII). La absorción es única con 5 placas por c.c. de suero.

Suero factor Vi. Ya que el antígeno Vi es inactivado por el calentamiento en suspensión acuosa, es imposible preparar un suero Vi fuerte sin aglutininas H, a menos que se disponga de un bacilo con Vi y que sea total y permanentemente inmóvil. Careciendo de este cultivo, se recurre la forma V de la *S. ballerup* para preparar el suero Vi. Este suero no sólo contiene aglutininas Vi sino también aglutininas H (z_{14}) y aglutininas O (XXIX), correspondientes a la *S. ballerup*. De aquí, puede prepararse un suero Vi puro, absorbiendo con la forma W de la misma salmonela.

En lo posible, sólo ocasionalmente se preparan y usan sueros con un sólo factor. Su uso rutinario no es necesario, por una observación cuidadosa de las reacciones dadas por una cepa con los sueros de la tabla III, sus antígenos somáticos se conocen ya. Los sueros absorbidos para antígenos V, X, XIV, XV y XXVII son los que más frecuentemente se usan siguiéndoles aquellos para los factores XX, XXII, XXIII, XXIV y XV. También se necesitan otros, pero los gérmenes que los contienen se encuentran muy rara vez. Ya que todos los bacilos que contengan antígeno IV reaccionarán con los sueros IV, V, XII y IV, XXIII, XII, no hay ninguna ventaja en usar ambos sueros en un examen preliminar de los factores O. El uso del suero IV, V, XII es más recomendable que el otro citado. En la misma situación están los sueros XIII, XXIII y I, XIII, XXIII; y los VI, XIV, XXIV y I, VI, XIV, XXV. En estos casos el uso de los sueros XIII, XXII y VI, XIV, XXIV, respectivamente, es de recomendarse, porque su uso elimina de las reacciones los cruzamientos debidos al antígeno I, presente en todas las salmonelas.

Ocurren a veces, reacciones anómalas entre ciertos sueros y antígenos. Estas reacciones son debidas, en parte, a una incipiente rugosidad en el cultivo usado para preparar el suero, pero también son debidas a relaciones antigénicas que no se conocen y por lo tanto, no se expresan en la tabla. Debe recordarse que sólo los antígenos con significado de diagnóstico se representan en el esquema de Kauffmann-White (Tabla 5), y que no se han hecho ensayos para delinear completamente los antígenos de los varios tipos. Cierta sobreposición de antígenos somáticos ocurre en combinación con un gran número de antígenos (por ej. I y XII) y puede, ocasionalmente, causar confusión; cuando exista una duda en lo concerniente a los antígenos somáticos de un cultivo, es de recomendarse recurrir al uso de sueros absorbidos.

TABLA 5

ESQUEMA DE DIAGNOSTICO DE KAUFFMANN WHITE. (1943)

TIPOS	FORMULAS ANTIGENICAS		
	Llave () antígeno que puede estar ausente, [] antígeno que es incompleto		
	Antígenos somáticos	Antígenos flagelares	
		Fase 1	Fase 2
GRUPO A			
S. paratyphi A	(I),II,XII	a	
GRUPO B			
S. paratyphi B	(I),IV,(V)	b	(1,2)
S. abony	(I),IV,V	b	e,n,x
S. typhi murium	(I),IV,(V)	(i)	1,2,3
S. stanley	IV,V	d	1,2
S. heidelberg	IV,V	r	1,2,3
S. chester	IV,(V)	e,h	e,n,x
S. salinatis	IV	d,e,h	d,e,n,z ₁₅
S. saint paul	I,IV,V	e,h	1,2,3
(S. zagreb)	IV,V	e,h	1,2
S. reading	IV	e,h	1,5
(S. kaposvar)	IV,V	e,[h]	1,5
S. kaapstad	IV	e,h	1,7
S. derby	(I),IV	f,g	
S. essen	IV	g,m	
S. budapest	I,IV	g,t	
S. californica	IV	g,m,t	
S. brandenburg	IV	l,v	e,n,z ₁₅
S. bispebjerg	I,IV	a	e,n,x
S. abortus equi	IV		e,n,x
S. arechavaleta	IV,(V)	a	1,7
S. abortus ovis	IV	e	1,6
S. altendorf	IV	c	1,7
S. abortus bovis	(I),IV,XXVII	b	e,n,x
S. bredeney	I,IV,(XXVII)	l,v	1,7
S. schleissheim	IV,XXVII	b,z ₁₂	
GRUPO C₁			
S. paratyphi C	VI,VII,(VI)	c	1,5
S. cholerae suis	VI,VII	(c)	1,5
S. typhi suis	VI,VII	(c)	1,6
S. thompson	VI,VII	(k)	1,5
S. montevideo	VI,VII	g,m,s	
S. oranienburg	VI,VII	m,t	
S. virchow	VI,VII	r	1,2,3
S. oslo	VI,VII	a	e,n,x
S. amersfoort	VI,VII	d	e,n,x
S. braenderup	VI,VII	e,h	e,n,z ₁₅
S. potsdam	VI,VII	l,v	e,n,z ₁₅
S. bareilly	VI,VII	y	1,5
S. hartford	VI,VII	y	e,n,x
S. mikawashima	VI,VII	y	e,n,z ₁₅
S. tennessee	VI,VII	z ₂₉	

FORMULAS ANTIGENICAS

Llave () antígeno que puede estar ausente,

[] antígeno que es incompleto

TIPOS

Antígenos somáticos

Antígenos flagelares

Fase 1

Fase 2

GRUPO C₂

<i>S. newport</i>	VI,VII,(VI?)	(e,h)	1,2,3
<i>S. kottbus</i>	VI,VIII	e,h	1,5
<i>S. muenchen</i>	VI,VIII	d	1,2
(<i>S. oregon</i>).....	VI,VIII	d	1,2,3
<i>S. manhattan</i>	VI,VIII	l,v	1,2,3
<i>S. bovis morbificans</i>	VI,VIII	r	1,5
<i>S. narashino</i>	VI,VIII	a	e,n,x
<i>S. bonariensis</i>	VI,VIII	i	e,n,x
<i>S. glostrup</i>	VI,VIII	z ₁₀	e,n,z ₁₅
<i>S. duesseldorf</i>	VI,VIII	z ₄ ,z ₂₄	

GRUPO D

<i>E. typhosa</i>	IX,(VI)	d	
<i>S. enteritidis</i>	(I),IX	g,m	
<i>S. dublin</i>	IX,I	g,p	
<i>S. rostock</i>	I,IX	g,p,u	
<i>S. moscow</i>	IX	g,q	
<i>S. blegdam</i>	IX	g,m,q	
<i>S. berta</i>	IX	f,g,t	
<i>S. sendai</i>	(I),IX	a	1,5
<i>S. durban</i>	IX	a	e,n,x? -e,n,z ₁₅
<i>S. onarimon</i>	I,IX	b	1,2
<i>S. eastbourne</i>	(I),IX	e,h	1,5
<i>S. panama</i>	I,IX	l,v	1,5
<i>S. dar es salaam</i>	I,IX	l,w	e,n
<i>S. goettingen</i>	IX	l,v	e,n,z ₁₅
<i>S. javiana</i>	(I),IX	l,z ₂₃	1,5
<i>S. gallinarum</i>	IX		

GRUPO E₁

<i>S. london</i>	III,X,XXXVI	l,v	1,6
<i>S. give</i>	III,X,XXXVI	l,v	1,7
<i>S. uganda</i>	III,X,XXXVI	l,z ₁₃	1,5
<i>S. anatum</i>	III,X,XXXVI	e,h	1,6
<i>S. muenster</i>	III,X,XXXVI	e,h	1,5
<i>S. nyborg</i>	[III,X,XXXVI]	e,h	1,7
<i>S. vejle</i>	III,X,XXXVI	e,h	1,2,3
<i>S. maleagrisidis</i>	[III,X,XXXVI]	e,h	l,w
<i>S. shangani</i>	III,X,XXXVI	d	1,5
<i>S. zanzibar</i>	[III,X,XXXVI]	k	1,5
<i>S. amager</i>	III,X,XXXVI	y	1,2,3
<i>S. lexington</i>	[III,X,XXXVI]	z ₁₀	1,5
<i>S. weltevreden</i>	III,X,XXXVI	r	z ₆

GRUPO E₂

<i>S. newington</i>	III,XV	e,h	1,6
<i>S. selandia</i>	III,XV	e,h	1,7
<i>S. new brunswick</i>	III,XV	l,v	1,7
<i>S. illinois</i>	[III],[XV],XXXIV	z ₁₀	1,5

TIPOS	FORMULAS ANTIGENICAS		
	Llave () antigénico que puede estar ausente, [] antigéno que es incompleto		
	Antígenos somáticos	Antígenos flagelares	
		Fase 1	Fase 2
GRUPO E₃			
S. senftenberg.....	I,III,XIX	g.s.t	
S. niloese.....	I,III,XIX	d	z ₆
S. simsbury.....	I,III,XIX	z ₂₇	
GRUPO F			
S. carrau.....	VI,XIV,XXIV	y	1,7
S. onderstepoort.....	[I],VI,XIV,XXV	e,[h]	1,5
S. florida.....	[I],VI,XIV,XXV	d	1,7
S. madelia.....	[I],VI,XIV,XXV	y	1,7
S. amherstiana.....	[VIII]	1,[v]	1,6
S. kentucky.....	[VIII],XX	i	z ₆
S. aberdeen.....	XI	i	1,2,3
S. rubislaw.....	XI	r	e,n,x
S. pretoria.....	XI	k	1,2 -1,2,3
S. grumpensis.....	XIII,XXII	d	1,7
S. poona.....	XIII,XXII	z	1,6
S. borbeck.....	XIII,XXII	l,v	1,6
S. mississippi.....	I,XIII,XXIII	b	1,5
S. wichita.....	I,XIII,XXIII	d	
S. havana.....	I,XIII,XXIII	f,g	
S. worthington.....	I,XIII,XXIII	l,w	z
S. hvittingfoss.....	XVI	b	e,n,x
S. gaminara.....	XVI	d	1,7
S. kirkee.....	XVII	b	1,2
S. cerro.....	XVIII	z ₄ z ₂₃ z ₂₅	
S. minnesota.....	XXI,XXVI	b	e,n,x
S. tel aviv.....	XXVIII	y	e,n,x ₁₅
S. ballerup.....	XXIX,(VI)	z ₁₄	
S. urbana.....	XXX	b	e,n,x

Antígenos H del Género Salmonela

Los antígenos H de las cepas de salmonelas se determinan por el uso de sueros con gran cantidad de aglutininas H y muy pocas O. Los métodos y diluciones empleados en el uso de estos sueros son tales que sólo aparezca la aglutinación flagelar en la prueba. Por el uso de los sueros anotados en la tabla n° 4, en su examen, todos los antígenos flagelares de las cepas de salmonela conocidas, pueden ser identificados.

Preparación de los sueros H.—Los antígenos usados en la preparación de estos sueros son cultivos en caldo de bacilo activamente móvil y diluido con suero fisiológico que lleva 0.6% de formol. Es extremadamente importante que sólo cultivos francamente móviles se usen como antígenos, ya que los antígenos H se encuentran asociados a los flagelos y una movilidad activa es el mejor índice de la presencia de flagelos. Si se desea usar una cepa dada para la producción de suero y el cultivo no es suficientemente móvil, puede pasarse a través de medios albuminosos, líquidos, y si ésto fallara puede recurrirse a sembrarlo en agar semisólido, para facilitar la mo-

vilidad. El agar semisólido, usado por Edwards y Bruner en 1942, (54), es una ligera modificación del de Jordan, Caldwell y Reiter (71) y su fórmula es la siguiente: 10 gr. de peptona Bacto, 3 gr. de extracto de carne, 80 gr. de gelatina Bacto, 4 gr. de agar Bacto, 5 gr de NaCl y 1000 c.c. de agua. Llevar a un pH de 7,2 a 7.4.

Si un cultivo de un bacilo móvil se siembra en este medio, en la superficie del tubo y se incuba una noche, los bacilos móviles se extenderán a través del medio. La parte superior del medio se calienta retirándose este agar fundido, dejando sólo el de la base. Resiembras hechas del fondo del tubo dan cultivos extremadamente móviles con un máximo desarrollo de los antígenos H. Cultivos en caldo hecho, en esta forma sirven admirablemente como antígenos para la producción de sueros flagelares.

Un antígeno en esta forma, puede ser usado en la preparación de un suero H para cualquiera de los tipos monofásicos de salmonela. Pero no es posible preparar todos los sueros H de diagnóstico a partir de sueros monofásicos y entonces es necesario aislar una fase del tipo difásico para usarla como antígeno. Cada fase del tipo difásico contiene trazas de la otra fase no indicada en la prueba de aglutinación, pero la cual produce aglutininas para la fase suprimida temporalmente cuando se inyecta a conejos. Por esta razón, el suero derivado de una fase de un tipo difásico es muy probable que contenga una pequeña parte de aglutininas para la otra fase. La cantidad de estas aglutininas "minor" en el suero, depende del cultivo usado y del cuidado que se tenga en el aislamiento de la fase para la cual se desea producir las aglutininas.

Un método de obtener una fase aislada, es la selección de colonias. Si un cultivo difásico se siembra en placa se pueden hallar colonias específicas y no específicas; el uso de una de las colonias específicas para la producción de un suero da usualmente un título no específico de un 5 a 20% del título específico. Una resiembra continuada y selección de las colonias específicas reduce la tendencia del cultivo a producir aglutininas no específicas. Este es un proceso largo y laborioso por lo cual es de recomendar mejor el método de Gard (72), en el que un suero aglutinante se añade a agar semisólido para inmovilizar la fase que se va a suprimir. Por ejemplo, para aislar la fase 1 de la *S. typhimurium* (IV, V, XII: i, 1, 2, 3...), un suero derivado de la *S. newport*, var. puerto rico (VI, VIII: 1, 2, 3...), se puede usar. Si el suero tiene un título aproximado de 1:10,000, basta añadir una décima de c. c. a 15 c. c. del agar fundido y poner la mezcla en una caja de Petri; después de que el agar se endurece se siembra en un extremo de la caja y ésta se incuba hacia arriba a 37°C. por 24 horas. Se encontrará que la fase 1 de la *S. typhimurium* (IV, V, XII:i) invadirá la placa, en tanto que la fase 2 (IV, V, XII: 1, 2, 3...) se inmoviliza en el lugar de la siembra por las aglutininas 1, 2, 3... del suero puerto rico. Los bacilos tomados del lado opuesto de la placa al sitio de la siembra, se resiembran en caldo por 12 a 15 horas y por regla general, dan cultivos altamente móviles.

Uso de los sueros H.—En forma similar a los sueros O, los sueros H se usaron en aglutinaciones en lámina. Los antígenos pueden ser de cultivos en gelosa suspendidos en suero fisiológico, aunque dan mejor resultado siembras en caldo formalinizadas posteriormente. Las diluciones de los sueros usados difieren con los títulos de los mismos. La práctica ha dado la evidencia de que hay relaciones flagelares no expresadas en la fórmula antigénica de varios tipos. Estas son relaciones pequeñas que no son de significado diagnóstico. Por ejemplo, el antígeno k se relaciona con el antígeno 1..., y el antígeno 1... se relaciona con los antígenos no específicos 1, 2..., 1, 5..., etc. Estas interrelaciones no interfieren en la búsqueda de factores únicos, ya que las relaciones cruzadas desaparecen cuando los sueros son absorbidos por factores únicos. Hay también una ligera interrelación entre los antígenos i y los r. El z_6 se

relaciona a las fases no específicas, especialmente a la 1, 5, así es que es necesario absorber este suero antes de usarlo.

Los métodos de absorción de estos sueros para dar factores únicos pueden consultarse en el trabajo de Edwards y Bruner (54), y como ejemplo, únicamente veremos la preparación del suero f: Un suero f, g... es absorbido por S. essen (g, m...), más S. budapest (g, t...). Es una absorción doble de cada salmonela para un c. c. de suero.

No es necesario probar cada cultivo con todos los sueros H, después de que los antígenos O se han identificado; refiriéndose al esquema de Kauffmann-White, prueba uno qué antígenos somáticos de cultivo bajo examen se hallan en combinación con los antígenos flagelares. Si el organismo es aglutinado, por ejemplo, con los sueros IV, V, XII, es un miembro del grupo B del esquema y puede probarse entonces con los sueros representativos de los antígenos H que constituyen las fases flagelares de los bacilos del grupo B. De sobra es decir que no hay que usar todos los sueros H del grupo, ya que algunos tipos se presentan muy frecuentemente y otros con gran rareza. Si un organismo es miembro del grupo B, es muy probable que sea S. typhimurium o S. paratyphi B y por consiguiente, es lógico probar el germen con suero b y con suero i, y con sueros no específicos 1, 2 y 1, 2, 3... Si el cultivo problema no aglutina puede entonces seguirse buscando con los otros antígenos flagelares del mismo grupo. Es inútil probar un germen con factores únicos absorbidos a menos de que reaccione con la totalidad de los sueros sin absorber que contengan el factor; por ejemplo, es inútil probar los antígenos v o w, a menos que el germen reaccione con los sueros 1, v... o 1, w... Igualmente, un germen se proba para los antígenos f, m, p, q, s, t, a menos que reacciones con f, g..., g, m..., g, p..., g, q..., g, s, t... ó m, t...

En el examen de los antígenos H de un cultivo de salmonela puede decirse que cualquier bacilo que contenga los antígenos g, m, t, z₄, z₁₄, z₂₇, o z₂₉ es monofásico y no es necesario buscarle otra fase. Por el contrario, si un bacilo contiene cualquier otro de los antígenos H del género, es casi seguro que sea difásico. Ambas fases de algunos cultivos difásicos (la mayoría), aparecen inmediatamente; si un organismo del grupo B es aglutinado por un suero b ó i, es casi seguro que también lo será por el suero 1, 2... ya que ambas fases se presentan generalmente en el cultivo. A veces sucede, especialmente en cultivos recién aislados de colonias únicas, que sólo se presenta una fase y entonces es necesario aislar la otra para completar su identificación. El aislamiento puede hacerse por siembras repetidas en placa, pero como ya se dijo, es mejor usar el método de Gard descrito anteriormente. En esta forma la fase deseada puede obtenerse.

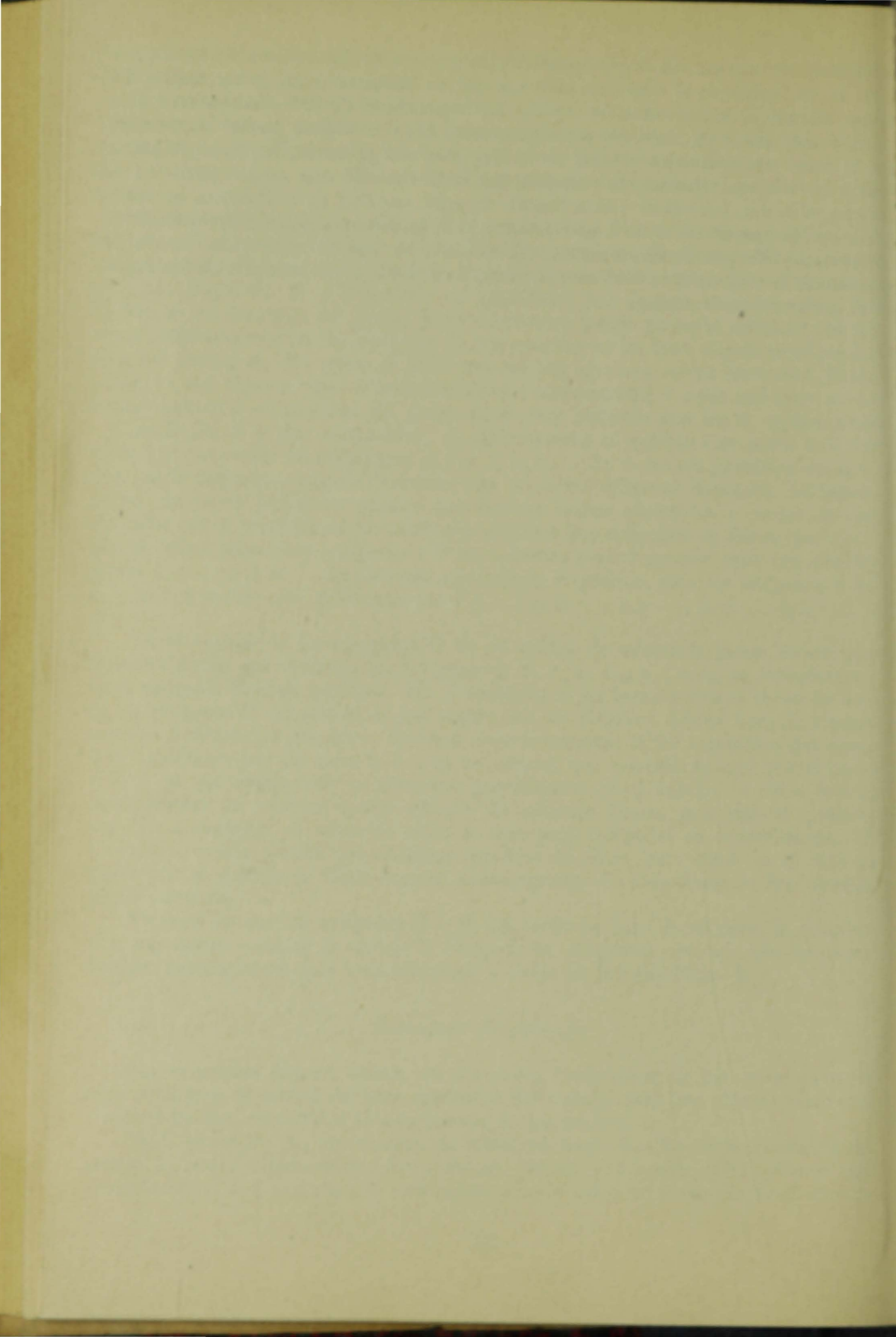
Después de que los antígenos O y H del bacilo se han identificado, su clasificación meramente consiste en checar la composición antigénica obtenida con las determinadas anteriormente para cada salmonela y dadas en la tabla Núm. 5.

Reacciones Bioquímicas

No se pueden dar, en detalle, las reacciones bioquímicas de los varios tipos de salmonela, pues se saldría del plan serológico del trabajo, pero hay algunas reacciones diferenciales que ayudaron a la clasificación de los bacilos.

La S. paratyphi A., no fermenta la xilosa en tanto que los otros miembros del género la atacan rápidamente. Sin embargo, Bruner y Edwards (73) notaron que ciertos cultivos de S. anatum y S. newington, a veces fallan en fermentar la xilosa o lo

hacen muy lentamente. La *S. paratyphi* A y la mayoría de los cultivos de la *S. paratyphi* B, no fermentan al d-tartrato mientras que en la mayor parte de los bacilos del género se observa la fermentación rápida. La *S. paratyphi* C, la *S. cholerae* suis y la *S. typhi* suis son muy similares serológicamente, pero la última puede identificarse por su corto crecimiento en medios artificiales. Las dos primeras fermentan la arabinosa y la trehalosa rápidamente mientras que la *S. cholerae* suis no las ataca. La *S. cholerae* suis, var. *kuzendorf* (monofásica) da gran cantidad de sulfhídrico, en tanto que la difásica no lo hace. La *S. gallinarum* y la *S. pullorum*, algunos autores las diferencian tan sólo por la fermentación del dulcitol, el cual es acidificado por la *S. gallinarum*, la cual también fermenta la maltosa en tanto que la mayoría de las cepas de *S. pullorum* no la atacan.



PARTE CUARTA

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 520 muestras de leche certificada obtenidas de toda la ciudad de México. De ellas se obtuvieron 24 cultivos positivos de gérmenes del género salmonela, lo que corresponde a una incidencia de 4.6%.

De esos 24 cultivos positivos se clasificaron 24 salmonelas, ya que ningún cultivo dió desarrollo para dos o más gérmenes diferentes. La distribución de estas cepas, según el esquema de Kauffmann-White se da en la tabla Núm. 6.

TABLA 6

ESPECIES	NUM. AISLADO
GRUPO A	
S. paratyphi A.....	1 veces
	<hr/> 1 "
GRUPO B	
S. derby.....	6 "
S. paratyphi B.....	5 "
S. typhimurium.....	2 "
S. chester.....	3 "
	<hr/> 16 "
GRUPO C	
S. newport.....	2 "
S. bovis morbificans.....	1 "
S. muenchen.....	1 "
	<hr/> 4 "
GRUPO D	
S. typhi.....	2 "
	<hr/> 2 "
GRUPO E	
S. senftenberg.....	1 "
	<hr/> 1 "

TOTAL: 24 cepas con 10 especies diferentes.

Ninguna de las especies anteriores es "nueva", para la ciudad de México. Todas ellas habían sido aisladas anteriormente de otras fuentes (alimentos, materias fecales, aguas contaminadas, etc.). Algunas de ellas como la *S. senftenberg* y la *S. bovis moribificans* son extremadamente raras y se han aislado muy pocas veces en América. En los datos estadísticos obtenidos por otros autores, se observa una concordancia con las frecuencias obtenidas en este trabajo. El grupo B es el más frecuente con 16 salmonelas, de las cuales, la *S. derby* se presentó 6 veces, siguiéndola la *S. parathyphi* B con 5 veces. Es de hacer notar que en el caso de la leche, aparecen con más frecuencia los bacilos tíficos y paratíficos que en otros productos alimenticios estudiados, como son carnes (74), huevos y pollos (75, 76).

La incidencia de contaminación de la leche en relación con otros alimentos, es mucho más baja (4.6%), pero, sin embargo, existen en ella gérmenes con acción patógena más definida, tífico y paratíficos, que en otros productos que contiene solamente o en forma predominante salmonelas de origen animal.

Como dato accesorio se da que en las 24 muestras contaminadas, se encontraron 7 de ellas (29.1%), con cultivos positivos para bacilo coli-faecalis, y en todas cultivos positivos para gérmenes fermentadores de la lactosa.

La diferenciación entre el *B. coli*, y el *A. aerogenes* se hizo usando el esquema propuesto por el American Health Institute (77), utilizando cuatro reacciones fundamentales, que son: la producción de indol, la reacción de Voges-Proskauer (producción de acetil-metil-carbinol), la reacción del rojo de metilo y el desarrollo en el medio de Koser (citrate sintético). Lo anterior hace sospechar el origen fecal de algunas contaminaciones, aunque sólo es una suposición, ya que pudieron haber dos contaminaciones diferentes, la fecal que aportó el *B. coli* y además, otra que aportó la salmonela.

Únicamente, bajo espíritu de control, se hizo ensayo de salmonelas en algunas leches pasteurizadas, hallándose que también existía en ellas la contaminación. Aunque este dato es de importancia, para darle valor requiere un estudio completo, ya que los hallazgos aislados de que se dispone hasta la fecha no son suficientes para afirmar este hecho. Por otra parte el presente trabajo sólo se hizo investigando leches certificadas; sería salirse de sus lineamientos profundizar sobre este aspecto.

PARTE QUINTA

RESUMEN Y CONCLUSIONES

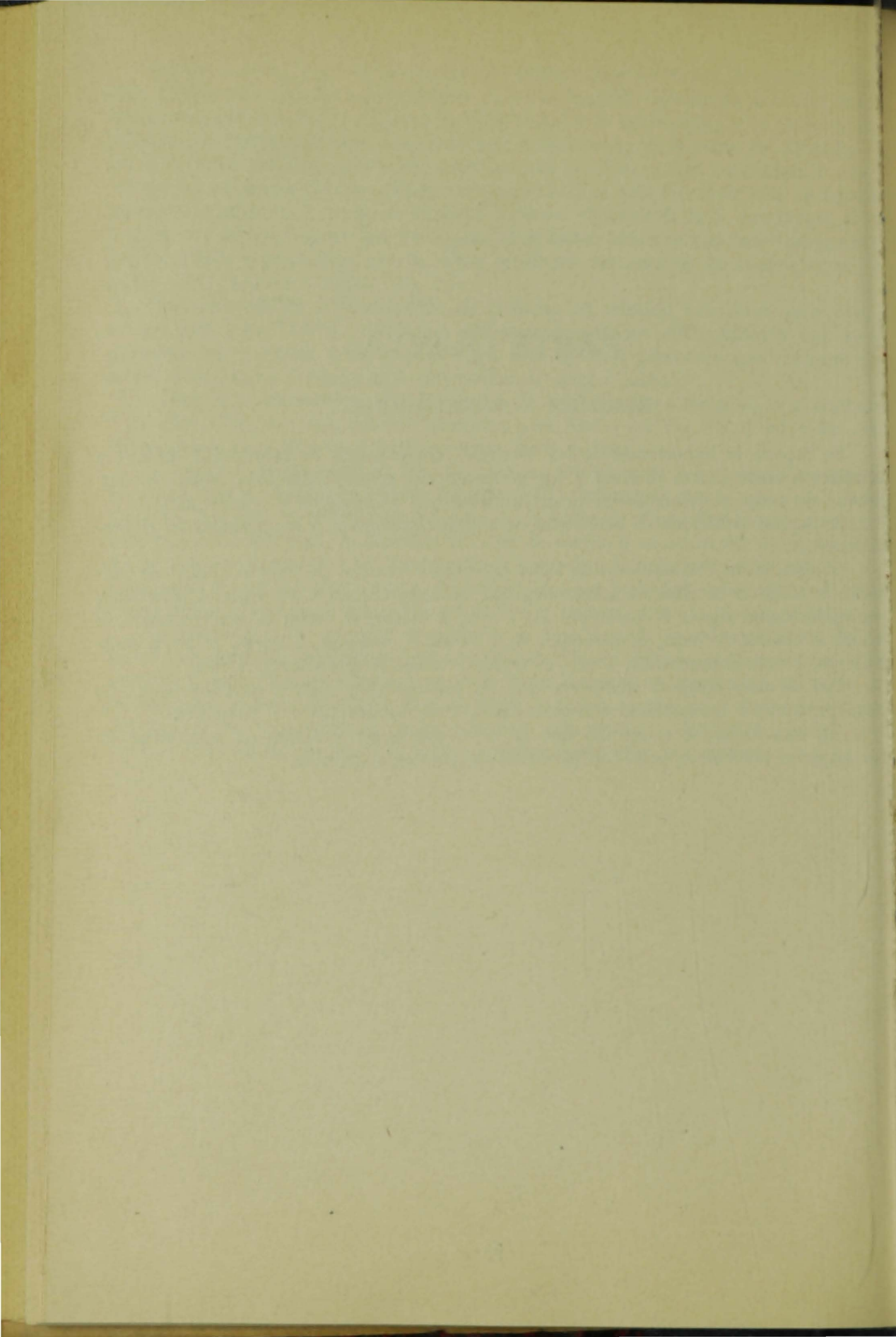
Se expone la importancia de las "diarreas" como causas de mortalidad infantil y la relación entre dichas diarreas y los gérmenes del género salmonela, según se desprende de trabajos desarrollados principalmente por Hormaeche y colaboradores.

Se explica el Método de Kauffman para aislar salmonelas, y sus ventajas en el presente año.

Se estudiaron 250 muestras de leche certificada tomadas de toda la ciudad de México. Se aislaron de ellas 24 salmonelas, que correspondieron a 10 especies diferentes, repartidas como sigue: *S. paratyphi A*, 1 vez; *S. derby*, 6 veces; *S. typhimurium*, 2 veces; *S. chester*, 3 veces; *S. paratyphi B*, 5 veces; *S. newport*, 2 veces; *S. bovis morificans*, 1 vez; *S. muenchen*, 1 vez; *S. typhi*, 2 veces; *S. senftenberg*, 1 vez.

No se aisló ninguna salmonela que no hubiera sido aislada anteriormente. Se notó predominio comparando con otras fuentes, de bacilos tífico y paratíficos.

En esta forma se comprobó que la leche puede ser vehículo de salmonelas en un pequeño porcentaje, pero con gérmenes de patología definida.



BIBLIOGRAFIA

- 1.—Hormaeche (E.); Peluffo (C. A.); Aleppo (P. L.)—Arch. Urug. Med. Cirug. y Esp. 1936, IX, 113-162.
- 2.—Hormaeche (E.); Peluffo (C. A.); Aleppo (P. L.)—Z. Hyg. 1937, 119 453-458.
- 3.—Hormaeche (E.); Peluffo (C. A.); Aleppo (P. L.)—Arch de Ped. del Urug. 1940, XI, 8-28.
- 4.—Hormaeche (E.)—Inf. Oficial, Soc. Urug. Ped. a la X Jornada Ped.—Riplatense. Montevideo. 7-24.
- 5.—Hormaeche (E.)—Arch. de Ped. del Urug. 1939, 8, 445-462.
- 6.—Zozaya (J.); Varela (G.)—Rev. Mexicana de Biol. 1932, 2-3, 1-21.
- 7.—Smith (J.); Kauffmann (F.)—J. Hyg. 1934, 34, 351-360.
- 8.—Habs. (H.)—Zeitsch. Hygiene. Infekt. 1934, 116, 537-549.
- 9.—Schiff (F.)—J. Amer. Med. Ass. 1938, 27, 2458-2460.
- 10.—Schiff (F.); Strauss (L.)—J. Infect. Dis. 1939, 2, 125-126.
- 11.—Guthrie (K. J.); Montgomery (G. L.)—J. Path. Bact. 1939, 49, 393-409.
- 12.—Abramson (H); Frant (S.); Oldenbusch (C.)—Medical Clinics North America. 1939, 3, 591-606.
- 13.—Pío de Roda (A.)—J. Philippine Islands Med. Ass. 1939, 19, 73-78.
- 14.—Smith (J.); Kauffmann (F.)—J. Hyg. 1940, 40, 122-123.
- 15.—Varela (G.); Zozaya (J.)—Anales Esc. Nac. Cienc. Biol. 1940, I, 119-127.
- 16.—Aballí (A. A.)—Arch. Med. Infantil. 1941, 3, 158-169.
- 17.—Briceño Iragorry (L.)—Gaceta Médica Caracas. 1942, 1-2-3-4, 46-68.
- 18.—Bornstein (S.); Schwarz (H.)—Amer. J. Med. Sciences. 1942, 4, 546-556.
- 19.—Varela (G.); Zozaya (J.); Olarte (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 1942, 3, 209-211.
- 20.—Varela (G.); Olarte (J.)—Ciencia Rev. Hispanoamericana de Ciencias. 1943, 4-5, 106.
- 21.—Varela (G.); Olarte (J.)—Rev. de Medicina. 1940, 408, 107.
- 22.—Varela (G.); Olarte (J.)—Rev. Mexicana de Med. 1942, 417, 384.
- 23.—Varela (G.); Zozaya (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 1942, 2 1-4.
- 24.—Varela (G.); Zozaya (J.); Olarte (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 1942, 3 209-211.
- 25.—Varela (G.); Olarte (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 1942, 4, 289-292.
- 26.—Varela (G.); Téllez Girón (A.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 2, 139-143.
- 27.—Varela (G.); Olarte (J.)—Ciencia. (Rev. Hispanoamericana Cienc.). 1943, 4-5, 106.
- 28.—Varela (G.); Olarte (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop.
- 29.—Varela (G.); Olarte (J.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. V, I, II-14.
- 30.—Varela (G.); Oliveros R. (S.)—En prensa.
- 31.—Bustamante (M. E.); Aldama (A. C.)—Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 1942, 2, 81-92.
- 32.—Neter (E.)—Gastroenterology. 1943, 1, 4, 367-382.
- 33.—Weil (W.)—Jour. Immunol. 1943, 46, 1-13.
- 34.—Hormaeche (E.); Bonaba (J.); Carrau (A.); Zerbino (V.)—Informe of. de la Soc. Urug. de Ped. a la X Jornada Pediátrica Rioplatense. 1940, pp. 18.
- 35.—Lembcke (A. P.)—Amer. Jour. Hyg. 1941, 33, 2, 42-50.
- 36.—Topley (W. W. C.); Wilson (G. S.)—The Principles of Bacteriology, and Immunity. Williams and Wilkins Co. 1941, 1587-1601.
- 37.—Wilson (G. A.)—Lancet. 1933, II, 829.

- 38.—Armstrong (C.); Parran (F.).—Pub. Health. Rep. Wash. 1927. Suppl. Núm. 62.
- 39.—Hassler (H.); Williams (A.).—American Jour. Pub. Health. 1930, 20 (2), 137-146.
- 40.—Relación de expendios de leche que controla la Sección Técnica de Higiene Veterinaria dependiente de la Dirección de Salubridad en el Distrito Federal. 1942. Mesa de "Leches" Prop. por J. López Chavero.
- 41.—Kauffman (F.).—Zen fur. Bakt 1930. 1931, CXIX, 158-160.
- 42.—Hormaeche (E.); Peluffo (C. A.).—Edit. Med. J. García Morales. Montevideo Diag. Bacteriol. de las Salmonelosis. 1940, 133-135.
- 43.—Varela (G.); Zozaya (J.).—Anl. Esc. Nac. Cienc. Biológicas. II, 1, 1940, 119, 127.
- 44.—Hormaeche (E.); Surraco (N. L.).—Arch. Urug. Med. Med. Cirug. y Esp. 1941, XVIII, 6, 485-503.
- 45.—Müller (L.).—C. R. Soc. Biol. 1923, 89, 434.
- 46.—Kauffmann (F.).—Die. Bakteriologie der Salmonella gruppe 1941. Copenhage. Einar Munksgaard; (Cita).
- 47.—Levi (M.); Schoenleim (H. W.).—Monographs on Systematic Bacteriology. A compilation of cultural media for the cultivation of Microorganisms. Williams and Wilkins, 1930.
- 48.—Kligler (J.).—J. Esper. M. 1918, 28, 319-322.
- 49.—Salmon (D. E.); Smith (T.).—S. Bur. Anim. Indus. 2 d. animal rep. 1885, 184. (Cita Edwards y Bruner.)
- 50.—Smith (F.); Stewart (J. R.).—1897 Boston Soc. Med. Sci. Jour. 16, 12. (Cita de Edwards y Bruner.)
- 51.—White (P. B.).—1926 (Gt. Brit.) Med. Rev. Council. Spec. Rept. Serv. M. 103.
- 52.—Salmonella Subcomite 1940. Report of the Subcomite of the Nomenclature Commite of the International Association of Microbiologists on the genus Salmonella. 3rd. International. Cong. Microbiol. Proc. 832.
- 53.—White (P. B.).—1939. (Gt. Britain) Med. Res. Council. 4, 86, 152.
- 54.—Edwards (P. R.); Brunner (D. W.).—1942. Ky. Agr. Esp. Sta. Ci. 54.4.
- 55.—Kauffmann (F.).—1936. Ztschr. Hyg. 119-352.
- 56.—Weil (E.); Felix (A.).—1918 Weil Klin. Wchuschr 31. 896. (Cita Edwards y Bruner.)
- 57.—Arkwright (J. A.).—1921 Jour. Path. and Bact. 28, 3 45.
- 58.—Schuetze (H.).—1921. Jour. Hyg. (London). 20. 330.
- 59.—Pampana (E. J.).—1933. Jour. Hyg. (London). 33. 402.
- 60.—Felix (A.); Pitt (R. M.).—1934. Jour. Path. and Bact. 38, 409.
- 61.—Peluffo (C. A.).—1941. Soc. Espt. Biol. and Med. Proc. 48, 340.
- 62.—Craigie (J.); Brandon (K. F.).—1936. Jour. Path. and Bact. 43, 233.
- 63.—Giovanardi (A.).—1938. Zenth. f. Bakt. Abr. I, 141, 341. (Cita Edwards y Bruner.)
- 64.—Kauffmann (F.).—1936. Ztschr J. Hyg. 117, 778.
- 65.—Kauffmann (F.).—1940. Acta Path. et. Microbiol Scand. 17, 135. (Cita Edwards and Bruner.)
- 66.—Kauffmann (F.).—1941. Jour. Bact. 4, 127.
- 67.—Andrewes (F. W.).—1922. Jour. Path. and Bact. 25, 505.
- 68.—Andrewes (F. W.).—1925. Jour. Path. and Bact. 28, 345.
- 69.—Kauffmann (F.); Mitsui (C.).—1930. Ztschir. f. Hyg. III. 740.
- 70.—Edwards (P. R.); Brunner (D. W.).—1938. Jour. Hyg. (London). 38, 716.
- 71.—Jordan (E. O.); Caldwell (M. E.); Reiter (D.).—1934, Jour. Bact., 27, 165.
- 72.—Gard. (S.).—1937. Ztzchr f. Byg. 120, 59.
- 73.—Brunner (D. W.); Edwards (P. R.).—1941. Amer. Jour. Hyg. 34, 82.
- 74.—Cherry (W. B.).—1933. Am. J. Hyg. 37: 211.
- 75.—Rubinstein (A. D.); Feenster (R. F.); Smith (H. M.).—1944. Am. Pub. Health. 34, 841.
- 76.—Jungherr (E.); Clancy (C. F.).—1939, J. Infect. Dis. 64, 1-17.
- 77.—Standard Methods of Water Analysis. Amer. Pub. Health Office. 1936. New York.