

Producción de un suero aglutinante "O" IV-V-XII Salmonella Stanley

Por el Dr. ELADIO JARAMILLO M.
Profesor de la Facultad

La cepa Stanley usada para la preparación de este suero fue obtenida en el Instituto Zooprofiláctico de Brescia (Italia) y provenía del Instituto de Higiene Humana del Profesor Giovanardi en Milán, figuraba bajo el N° 1158 y su estado era liofilizado.

La cantidad de cultivo bacterico en estado liofilizado, fue disuelto en unas gotas de caldo simple estéril y sembrado en probetas de agar inclinado e incubado por 18 horas a 37° C. Del cultivo así obtenido sembré 6 cajas de agar-petri para la obtención de colonias aisladas, empleando la técnica de dilusión.

Para determinar su fase, las colonias fueron examinadas bajo esteroscopio con luz indirecta y para la obtención de una completa fase S, las colonias fueron sembradas en agar-glicerinado por 3 veces. La fase S quedó asegurada por la técnica de Alexandrini y Sabatucci, Thjta Waller y Prueba de la Ebullición excluyendo así las formas R del cultivo.

La identificación morfológica de la Salmonella en cuestión quedó asegurada con frotis coloreados por el método de Gram modificado por Huckner, pruebas de movilidad, etc.

Las pruebas bioquímicas dieron para los 6 cultivos los resultados siguientes:

Glucosa	+	a las 24 horas.
Sacarosa	-	" "
Manita	+	" "
Urea	-	" "
Indol	-	" "
Gelatina	-	" "
Rojo de Metilo	+	a las 96 horas.
Voges Prosk	-	" "
Citrato de Amon.	+	" "
Salicina	-	a las 24 horas.
Movilidad	+	" "

Siguiendo la técnica general trazada por el Dr. F. Kauffmann, se prepararon los antígenos "O" de Salmonella Stanley, para ello empleé los métodos de caldo-cultivo y el método de Roscka.

Después de obtenidos los antígenos por cada uno de los métodos, procedí a la preparación de los sueros, inoculando por vía intravenosa (vena de la oreja). Dos lotes de conejos fueron seleccionados entre los 2.600 y 3.200 gramos de peso, que fueron puestos en condiciones ambientales y nutricionales óptimas para todos.

Las inoculaciones se hicieron en la siguiente forma:

LOTE N° 1

Conejo N°	Dic. 19/58	Dic. 24/58	Dic. 29/58	En. 7/59	En. 12/59
208	0.25 c.c.	0.5 c.c.	1 c.c.	1.5 c.c.	3 c.c.
221	0.25 c.c.	0.5 c.c.	1 c.c.	1.5 c.c.	3 c.c.
226	0.25 c.c.	0.5 c.c.	1 c.c.	1.5 c.c.	3 c.c.

Este lote fué inoculado con el antígeno producido por el método de Caldo-cultivo.

LOTE N° 2

Conejo N°	Dic. 19/58	Dic. 24/58	Dic. 29/58	En. 7/59	En. 12/59
232	0.5 c.c.	1 c.c.	2 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
233	0.5 c.c.	1 c.c.	2 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
246	0.5 c.c.	1 c.c.	2 c.c.	4 c.c.	4 c.c.

Este lote fué inoculado con el antígeno producido por el método de Roscka,

El conejo N° 246 murió después de la cuarta inoculación, a la autopsia reveló una cisticercosis.

A los 8 días de la última inoculación se hizo una sangría de prueba, tomando de la vena marginal de la oreja y por punción 5 c.c. de sangre utilizada para una aglutinación de prueba, dejando los conejos en completo reposo.

El suero obtenido fué clarificado y centrifugado, como también inactivado al baño-maría por 30 minutos a 56 grados C.

Hice diluciones del suero de cada uno de los conejos que van de 1:10 hasta 1:20.480. La aglutinación de prueba se efectuó en la siguiente forma y en probetas:

Suero hiperimmune Stanley de cada dilución	0.50 c.c.
Antígeno Stanley	0.50 c.c.
<hr/>	
Total en cada probeta	1 c.c.

Los títulos obtenidos al afectar la aglutinación individual de cada suero fueron los siguientes:

Suero N° 221	1:1280
Suero N° 233	1:400
Suero N° 226	1:400
Suero N° 232	1:640
Suero N° 208	1:5.120

Nota: Los controles en cada aglutinación fueron negativos.

A los resultados de la aglutinación de prueba, inmediatamente se procedió a la sangría total de los 5 conejos, usando el método de canulación de la carótida, la sangre fué recibida en recipientes estériles. La sangre y el suero sufrieron el mismo procedimiento que para la aglutinación de prueba: clarificación, inactivación, etc.

Usando las mismas diluciones de prueba 1:10 a 1:20.480 y efectuando la aglutinación en probeta en iguales cantidades a la aglutinación de prueba, se obtuvieron los siguientes resultados después de 20 horas al baño-maría y 4 horas de reposo el medio ambiente:

Suero N° 226 título aglutinante	1:400
Suero N° 232 título aglutinante	1:400
Suero N° 233 título aglutinante	1:200
Suero N° 208 título aglutinante	1:640
Suero N° 221 título aglutinante	1:1280

Para asegurar la conservación de los sueros fueron liofilizados así:

Congelación a -40 grados C. por 30 horas.

Vacío a -25 grados C. y a 100 micrones Terne.

Desecación del contenido de cada ampolla 1 c.c. al vacío y con anhídrido fosfórico.

Secado escudario y cerrado al vacío.

La aglutinación lenta de los sueros producidos fué probada después del proceso de liofilización con los siguientes resultados:

Suero N° 226 título aglutinante	1:400
Suero N° 232 título aglutinante	1:400
Suero N° 233 título aglutinante	1:200
Suero N° 208 título aglutinante	1:640
Suero N° 221 título aglutinante	1:1280

Control de sueros Nos. 226, 232, 233, 208 y 221 Stanley con Antígenos Somáticos.

Con el fin de determinar la dilución de uso de los sueros producidos, procedí a la preparación de 26 antígenos somáticos específicos y no específicos, que fueron probados con cada suero, efectuando la aglutinación lenta en probeta y la aglutinación rápida en lámina.

Las cepas-tipos de Salmonella empleados en este trabajo fueron tomadas del cepario del Instituto Zooprofiláctico Experimental de Brescia (Italia) y provenientes, unas del "Kauffmann-Chief International Salmonella Center", State Serum Institute Copenhagen Denmark, y otras de la Facultad de Medicina de Milán. Profesor Giovanardi.

Las cepas-tipos específicas empleadas para la producción de antígenos y cuyos respectivos cultivos fueron conservados en refrigeración para la aglutinación rápida, fueron las siguientes:

Salmonella abortus equi. (4 cepas distintas).
 .. Reading.
 .. Chester.
 .. Derby.
 .. Typhimurium.
 .. Stanley-Ville.
 .. Kaposvar.
 .. Heilderberg.
 .. Bredeney.
 .. California.
 .. Essen.
 .. Texas.
 .. San Diego.
 .. Paratyphi.
 .. Abortus ovis.
 .. Shleissheim.

Las cepas-tipos inespecíficas empleadas fueron las siguientes:

Salmonella Thompson.
 .. Montevideo.
 .. Oraniemburg.
 .. Bareilly.
 .. Newington.
 .. Zansibar.
 .. Onderstepoort.

Los antígenos somáticos fueron preparados por los métodos del caldo-cultivos, controlando la fase S (no aglutinación y pruebas de control de fase).

Como el índice de opacidad de los antígenos, puede interferir en el resultado de la aglutinación ya que la concentración de gérmenes varía para cada antígeno, empleé para medir dicha opacidad un turbidímetro eléctrico empleado en el Instituto para medir la concentración de Brucellas por c.c. Este aparato estaba calibrado para obtener una concentración de gérmenes en cantidad de 6.000.000.000 que corresponden al N° 60 de la graduación. Tomando como base esta cifra y haciendo una relación con el tamaño del germen Salmonella, que es mayor, a dicha cifra correspondería una concentración aproximada de 1.500.000.000 por C.C.

Los grados de opacidad Lange variaron en un mínimo de 18 para el antígeno de la Sal. abortus ovis y un máximo de 45 para el Antígeno de la Sal. Onderstepoort.

El control del poder aglutinante de los Antígenos fué asegurado con la prueba correspondiente y la lectura fué negativa después de 20 horas al baño-maría a 50 grados C. y reposo al medio ambiente.

Los sueros Nos. 226, 232, 233, 208 y 221 Stanley fueron aglutinados con los antígenos somáticos específicos IV, V, XII en aglutinación lenta en tubo, usando diluciones del suero Stanley de 1:10 a 1:2560. Cada suero fué probado con los antígenos somáticos específicos de las Salmonellas anotadas, con los siguientes resultados:

El suero N° 226 tuvo una aglutinación somática positiva mínima de 1:40 con los antígenos somáticos de las Salmonella: Reading, Sal. Kaposvar, Sal. California, Sal Essen y Sal Paratyphi B y una aglutinación máxima de 1:640 con los antígenos somáticos de las Salmonellas abortus equi y abortus ovis. Con los antígenos somáticos inespecíficos fué negativa a todos los títulos del suero; los controles fueron negativos también.

El suero N° 232 tuvo una aglutinación mínima de 1:20 con los antígenos específicos somáticos de Sal. Reading, Sal. Stanley Ville y una aglutinación máxima con los antígenos somáticos específicos de la Sal. Abortus equi y abortus ovis. Con los antígenos somáticos inespecíficos fué negativa, igualmente para los controles.

El suero N° 233 tuvo una aglutinación mínima de 1:40 con los antígenos somáticos específicos de Sal. Kaposvar, Sal. Heildelberg, y Sal. Paratiphi B y un máximo de 1:1280 con los antígenos somáticos específicos de la Sal abortus Equi y abortus ovis. Con los antígenos somáticos inespecíficos fue negativa la reacción, lo mismo con los controles.

El suero N° 208 tuvo una aglutinación mínima de 1:40 con los antígenos somáticos específicos de la Sal. Reading, Sal. Chester, Sal. Kaposvar, Sal. Heidelberg, Sal. California y Sal. Texas. Con los antígenos somáticos inespecíficos la reacción fué negativa, lo mismo para los controles.

El suero N° 221 tuvo una aglutinación mínima al título 1:80 con los antígenos somáticos específicos de Sal. Reading, Sal. Chester, Sal. Derby, Sal. Stanleyville, Sal. Kaposvar y Sal. California, y una máxima de 1:640 con el antígeno somático específico de la Sal. Shleissheim y Sal. Abortus equi. Con los antígenos somáticos inespecíficos la reacción fué negativa, lo mismo para los controles.

Control de los sueros Nos. 226, 232, 233 208 y 221 por medio de la aglutinación rápida en lámina.

Para la aglutinación rápida se obtuvieron cultivos en colonias aisladas de cada una de las cepas-tipos usadas en el presente trabajo, los cultivos fueron conservados en refrigeración a más de 4 grados C. Antes de hacer la reacción de aglutinación rápida, cada cultivo fué examinado microscópicamente y bajo el estereoscopio para determinar la fase S. Los cultivos en fase R fueron descartados y reemplazados por cultivos jóvenes.

Las diluciones de cada suero fueron de 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40.

La técnica empleada fue la siguiente: En una lámina de vidrio se coloca una gota de cada una de las diluciones del suero (1:5, 1:10, 1:20, 1:40). La lámina se encuentra situada en el extremo de la tapa superior de un dispositivo especial en forma de cajón. La lámina va iluminada con luz indirecta por un sistema de espejos y sobre un fondo negro que ayuda al operador a distinguir en forma clara la aglutinación.

Estérilmente se escoge entre cultivo una de las mejores colonias, se toma con el anza 1/4 de colonia para mezclar a cada gota de las diluciones del suero. El anza a usar es la común del Laboratorio que termine en punta de aguja. Utilizando la misma anza se hace una mezcla homogénea y observar cuidadosamente. Solo con una larga práctica se llega a distinguir ya sea la aglutinación granular "O", o la flocular "H", o la reacción negativa que da una mezcla homogénea opaca.

Cuando se trabaja en aglutinación rápida, debe tenerse al lado un recipiente con formalina (sol. al 10%) para eliminar las láminas usadas, que al ser contaminadas con cultivos puros, son fuente de contagio individual o del personal del Laboratorio.

Los resultados de la aglutinación rápida en lámina fueron los siguientes para los 5 sueros: utilizando 20 cultivos de los diversos tipos de Salmonellas, 15 específicas somáticamente y 5 inespecíficas, y utilizando diluciones del suero 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, mezclando cada una de estas diluciones con 1/4 de colonia típica-S de cada cultivo:

Suero N°		Título
226.	Aglutinación +	mínima . . . 1:10
232.	" +	" 1:10
233.	" +	" 1:10
208.	" +	" 1:10
221.	" +	" 1:10

La aglutinación somática de los 5 sue-

ros con cada una de las colonias del cultivo de las Salmonellas inespecificas, fue negativo en todas las reacciones efectuadas.

El control de aglutinación rápida en lámina efectuada en la gota de control fue negativa para todas las reacciones.

CONCLUSIONES:

1 — Los sueros preparados en dos lotes de conejos, usando los antígenos "O" de Salmonella Stanley, preparados con los métodos de Caldo-cultivo formulado y método de Roscka, no difieren en su título final de uso en la práctica.

2 — El suero Stanley "O" IV, V, XII producido y conservado con Mertiolato ha sido controlado para fijar las soluciones de su uso en la práctica así:

Para la aglutinación lenta en probeta	1:40
Para la aglutinación rápida en lámina	1:10

3 — Se pretende dar un ejemplo sobre preparación de sueros monovalentes y polivalentes, usados corrientemente en la tipificación del género Salmonella.

BIBLIOGRAFIA

1 Angelucci-Nardelli (1948). Standardizzazione Delle Tecniche Dell Esame Batteriologico Delle Carni «Atti Della Societa Italiana

delle Scienze Veterinarie» Estratto 174-185.

2 Buxton A. (1957). Salmonellosis en Animals. 45-56.

3 Clarendburg A. Dr. (1946). Informe N° 14 del XII Congreso Internacional de Medicina Veterinaria, New York.

4 Edwards P. R. - Ewing W. H. (1956). Identification of Enterobacteriaceae.

5 Kauffmann F. M. D. (1957). Das Kauffmann-White Schema (diagnostisches Salmonella Antigen Schema) Ergebnisse der Mikrobiologie Inmuntatsforschung und Experimentellen Therapie 30-1 60-206.

6 Kauffmann F. M. M. (1954). Enterobacteriaceae. Second Edition.

7 Kauffmann F. M. D. (1950). The Diagnosis of Salmonella Types.

8 Nardelli L. Prof. (1959). Dirección y Comunicaciones personales, Instituto Zooprofiláctico Experimental. Brescia (Italia).

9 Parvis D. - Nardelli L. Prof. (1948). I Moderni Metodi di classificazioni Sierologica dei Colombacteri. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie. Vol. 2. Estratto. 83-92.

10 Readeli G. Dr. (1955). Indagini Biochimiche e Sierologiche su 400 ceppi di Salmonella Isolati degli animale in Italia. Estratto dall «Archivio Veterinario Italiano» Vol. 6 Fas. 2 133-144.

11 Topley and Wilson's. (4ª edición) (1953). Bacteriología e Inmunidad.