

## CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA CLASIFICACION DE LAS PASTEURELLAS\*

(PRIMERA COMUNICACION)

Por INDA S. MIRAVET DE ISSALY y ABEL S. ISSALY

Numerosos investigadores se han ocupado del problema de la clasificación de las Pasteurellas, sin que hasta la fecha se haya llegado a una conclusión definitiva.

Hueppe (1886) y Kitt (1885) encabezan la lista de investigadores que sostienen la teoría unicista de clasificación de Pasteurellas. Les siguen, entre otros, Baumgarten (1911), Schirop, Gallagher, Bollinger, Chamberland y Jouan (1906); Citron y Puts, Mohler (1913), Hutira (1925), Migge (1923), Manniger (1934), etcétera.

Otra serie de trabajos considera que deben clasificarse estos gérmenes en subgrupos, de acuerdo a determinadas características morfológicas y biológicas.

Lignières (1900) el primero de ellos, considera la clasificación por especie, que es la que se sigue hasta la fecha y que sería la siguiente:

- 1) *Pasteurella* de ave.
- 2) *Pasteurella* de puerco.
- 3) *Pasteurella* de carnero.
- 4) *Pasteurella* de bovino.
- 5) *Pasteurella* de equino.
- 6) *Pasteurella* de can.

Matsuda (1910), Yusef (1921) y Roderick (1922) basan la clasificación en las reacciones de aglutinación.

Existe otra clasificación basada en caracteres culturales, bioquímicos y serológicos, en:

- 1) Grupo típico o de *Septicemia hemorrágica*.
- 2) Grupo atípico o de *Pasteurella hemolítica*.

El grupo 2) ha sido estudiado por Jones (1921),

Spray (1923), Jørgensen (1925), Eddigton (1930) y New-som y Cross. El grupo 1) ha sido objeto de estudios por parte de Roderck (1922), Koske (1927), Cornelius (1929), Zaisen (1934), Yusef (1935) y Kalifa (1936).

Otras clasificaciones han sido propuestas por Meyer y Batcheler (1926), Lal (1927), Cornelius (1929), Morch y Krogh-Lund (1930), etc.

La actual clasificación dada por Topley y Wilson es la siguiente:

- 1) *Pasteurella aviséptica.*
- 2) *Pasteurella boviséptica.*
- 3) *Pasteurella suiséptica.*
- 4) *Pasteurella lepiséptica.*
- 5) *Pasteurella Muriséptica.*
- 6) *Pasteurella vituliséptica.*
- 7) *Pasteurella bubaliséptica.*

Es decir, pues, que, hasta la fecha, ni la clasificación por especies, larga y arbitraria, ni las clasificaciones por reacciones de aglutinación o por desviación del complemento, por fermentación de azúcares o de otras sustancias han sido lo suficientemente convincentes como para adoptar definitivamente una de ellas.

Con el deseo de aportar nuevos elementos de juicio que permitan llegar a una conclusión, es que hemos realizado el presente trabajo.

Nuestras experiencias se han basado en el siguiente plan:

- 1) Estudio de la fermentación de azúcares ópticamente activos por cepas del género *Pasteurella*.
- 2) Estudio de las reacciones de aglutinación de los inmuno sueros de Pasteurellas, frente a eritrocitos de paloma.
- 3) Estudio de la composición química del antígeno de las Pasteurellas.

Nuestra primera comunicación concierne al primer punto:

#### ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE AZUCARES OPTICAMENTE ACTIVOS POR CEPAS DEL GENERO PASTEURELLA

B. R. Pestana y Ettore Rugai al estudiar la fermentación de azúcares por cepas de Pasteurellas, comprobaron que: "Las cepas aisladas de aves fermentan con expresiva regularidad, la l - arabinosa, en cambio las cepas de

mamíferos no la fermentan". Consignan además que la fermentación de la l-xilosa tiene cierto valor y que cuando la *Pasteurella* ha fermentado la l-arabinosa, no ha fermentado la l-xilosa.

Con estos datos los autores proponen clasificar las *Pasteurellas* en:

- 1) Grupo fermentador de la l-arabinosa al cual denominan *Pasteurella Gamaleiae*.
- 2) Grupo no fermentador de la l-arabinosa, al cual denominan *Pasteurella Bollingeri*.

Considerando que dicha clasificación, podría aportar nuevos elementos de juicio para una clasificación más completa, resolvimos ratificar sus conclusiones.

#### MATERIAL DE EXPERIENCIA

Usamos como material de experiencia, las cepas de *Pasteurella* de la colección de la sección Peste del Instituto Malbrán, y las cepas aisladas por nosotros ya sea por siembra en agar y caldo, de la médula ósea de las ratas que llegan diariamente a la sección Peste, o por inoculación al cavia de los bazos de ratas provenientes de distintos puertos.

Fueron utilizadas de la colección del Instituto:

- 47 cepas de *Pasteurella de mamífero*.
- 7 cepas de *Pasteurella de ave*.
- 3 cepas de *Pasteurella pseudotuberculosis*.
- 1 cepa de *Pasteurella pestis*.

Cuya numeración se consigna en los cuadros correspondientes.

Todas estas cepas fueron reactivadas por sucesivos pasajes por cavia, comprobando el perfecto estado conservación de las mismas a pesar de tener algunas cepas más de diez años de conservación al vacío por el método de Neufeld, adaptado por Uriarte y Morales Villazón para las *Pasteurellas*.

Las cepas aisladas por nosotros fueron sistemáticamente estudiadas, habiendo aislado 10 cepas de *Pasteurella desde* el 10 de Octubre de 1947 al 10 de Setiembre de 1948, sobre un total de 13.828 ratas examinadas.

Las cepas 7, 15, 19, 40, 41, 231, fueron aisladas de médula ósea de ratas enviadas de La Plata y Capital. Las cepas 20, 43, 54 y 58 se obtuvieron de bazos de ratas provenientes de Rosario y Bahía Blanca.

A la observación directa, las colonias sembradas en agar, se presentaron como coco-bacilos bipolares, Gram negativos/, perfectamente coloreables por el azul de metileno y con la morfología típica de las Pasteurellas.

Los caracteres bio-químicos se registran en el cuadro siguiente:

Cepa	7	15	19	20	40	41	43	54	58	23
Movilidad	inm.									
Caldo	ent.									
Agar fildes	punt.									
Leche tornas.	acid.									
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NH <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rojo metilo	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Patata	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Voges Prosk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nitratos	red.									
Azul metileno	red.									
Stern	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gelatina	No licúa									
Mac Conkey	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lactosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	—	+	+ ó —	+	—	—	—	—	+	—
Maltosa	+ ó —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Inulina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arabinosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Dulcita	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eritrita	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—
Arabitol	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonita	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Melecitosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trehalosa	—	—	+	—	—	—	+	—	—	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbita	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Levulosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Salicina	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
Almidón	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—
Celulosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

inm. = inmóvil    ent. = enturbia    punt. = punteado  
acid. = acidifica    red. = reduce.

Todas las cepas fueron patógenas para el cavia, provocando su muerte en 24 horas por inoculación sub-cutánea y entre cuarenta y tres a setenta y dos horas por inoculación peritoneal. La autopsia nos dió el cuadro clásico de: aumento de ganglios, congestión, hemorragias; congestión y edema en las cavidades pleural y abdominal; abundante cantidad de gérmenes tanto en médula ósea como en el exudado peritoneal, el cual es filante, opalescente y mucho mayor en los cobayos inoculados por vía peritoneal.

Para efectuar las pruebas de fermentación tomamos como tipo la d-y l-arabinosa y la d-y l-xilosa, químicamente puras. Hicimos de ambas sustancias, diluciones en agua destilada al 10 %, en caliente y fraccionamos dichas diluciones en ampollas de 1 c. c., esterilizándolas luego por tyndalización.

Las cepas fueron cultivadas en el medio de agar nutritivo al 1 % preparado con agar común y caldo peptonado.

Este mismo medio fué usado para preparar el medio de azúcares, licuándolo a B. M., enfriándolo luego a 60 grados y agregándole 1 % de la solución de doble indicador.

Distribuimos dicho medio en tubos de 9 a 10 mmts. de diámetro, esterilizamos y dejamos enfriar.

El doble indicador responde a esta fórmula:

Fucsina ácida = 0,5 grs.

Azul de bromo timol = 0,5 grs.

Sol. de hidróxido de sodio N/10 = 20 c.c.

Agua destilada = c. s. p. 100 c/c.

Fórmula dada por el doctor Sosa en su trabajo: "Medio de cultivo para la selección de colonias, en el aislamiento de bacterias patógenas intestinales".

En el momento de efectuar las experiencias, licuamos el agar de los tubos y les agregamos la solución de azúcar en proporción de 1 %. Los dejamos enfriar e hicimos la siembra de la cepa en picadura.

Los tubos fueron dejados luego en la estufa a 37 grados durante 24 horas; al cabo de las cuales, se efectuó la primera lectura. Se hicieron lecturas sucesivas hasta el 30 día, manteniendo siempre los tubos en la estufa.

Los resultados dados por cada cepa están consignados en los cuadros que siguen:

## PASTEURELLAS DE MAMIFEROS

<i>C e p a</i>		<i>l-arabi- nosa</i>	<i>d-arabi- nosa</i>	<i>l-xilosa</i>	<i>d-xilosa</i>
Número	7.rata	—	—	—	—
„	15.rata	—	—	—	—
„	19.rata	—	—	—	—
„	20.rata	—	+	—	—
„	40.rata	—	—	—	—
„	41.rata	—	+	—	—
„	43.rata	—	—	—	—
„	54.rata	—	—	—	—
„	58.rata	—	—	—	—
„	231.rata	—	—	—	—
„	84.rata	—	—	—	—
„	100.rata	—	—	+	+
„	102.rata	—	—	—	—
„	103.rata	—	—	—	+
„	110.rata	—	—	—	—
„	111.rata	—	—	—	—
„	112.rata	—	—	+	—
„	50.rata	—	—	—	—
„	203.rata	—	—	—	—
„	205.rata	—	—	—	—
„	206.rata	—	—	—	—
„	50.rata	—	—	—	—
„	51.rata	+	—	—	+
„	44.rata	—	—	—	—
„	210.rata	—	—	—	—
„	211.rata	—	—	—	—
„	214.rata	+	—	+	+
„	215.cobayo	—	—	—	—
„	47.cobayo	—	—	—	—
„	43.cobayo	—	—	—	—
„	40.cobayo	—	—	—	—
„	116.rata	—	—	—	—
„	33.rata	—	—	—	—
„	228.rata	—	—	—	—
„	117.rata	—	—	—	—
„	232.rata	—	—	+	+
„	209.rata	—	—	—	—
„	34.rata	—	—	+	—
„	201.Roedor campestre	—	—	—	—
„	27.cerdo	—	—	+	+
„	6.cerdo	—	—	—	+ ó —
„	26.cerdo	—	—	—	—
„	113.rata	—	—	+	+
„	22.cobayo	—	—	+	+
„	14.conejo	—	—	—	—
„	207.cerdo	—	—	+	+
„	28.roedor	—	—	—	—

Es decir, que de 47 cepas de Pasteurellas de mamíferos:

95,78 % no fermentan la l-arabinosa.

95,78 % no fermentan la d-arabinosa

85,10 % no fermentan la d-xilosa

85,10 % no fermentan la l-xilosa

Logramos así un mayor porcentaje de cepas que no fermentan los azúcares antedichos, que el porcentaje consignado por los autores mencionados.

PASTEURELLAS DE AVES

Cepa	l-arabinosa	d-arabinosa	l-xilosa	d-xilosa
Nº 204 gallina	+	—	+	+
„ 11 aviaria	+	—	+	+
„ 53 aviaria	+	—	+	+
„ 13 aviaria	+	—	+	+
„ 211 gallina	+	—	+	+
„ 221 gallina	+	—	+	+
„ 52 gallina	—	—	+	—

De las siete cepas estudiadas de *Pasteurella aviaria*:

87,50 % fermentan la l-arabinosa

100,00 % no fermentan la d-arabinosa

100,00 % fermentan la l-xilosa

87,50 % fermentan la d-xilosa

Las conclusiones nuestras sobre la fermentación de l- y d-xilosa difieren de las dadas por los autores brasileños. En efecto, no hemos comprobado la coincidencia señalada por dichos autores, de cepas que fermentan la l-arabinosa y no fermentan la d-xilosa. Sino que por el contrario, de acuerdo a nuestras experiencias, las cepas de mamíferos no fermentan ni la arabinosa ni la xilosa, mientras que las cepas aviarias fermentan la l-arabinosa y ambas xilosas, vale decir que el comportamiento de las cepas frente a un azúcar es semejante al comportamiento frente al otro.

PASTEURELLAS PESTIS Y PASTEURELLAS PSEUDOTUBERCULOSIS

Cepa	l-arabinosa	d-arabinosa	l-xilosa	d-xilosa
Nº 81 Past. Pests	+	+	+	+
„ 96 Pseud. Tubercul. Pavo	+	+	+	+
„ 15 Pseud. Tubercul. Conejo	+	+	+	+
„ 66 Pseudo tuberc.	+	+	+	+

Tanto las tres cepas de *Pasteurella Pseudotuberculosis*, como la cepa de *Pasteurella pestis*, nos dieron:

100,00% de *Pasteurella pestis fermentan* l - y d-arabinosa y l- y d-xilosa.

100,00% de *Pasteurella pseudotuberculosis fermentan* l- y d-arabinosa y l- y d-xilosa.

El estudio de estas cepas fué hecho sólo para completar el estudio del resto de las Pasteurellas ya que como medio diferencial, la fermentación de estos azúcares es secundaria, pues, tanto la *Pasteurella pestis* como la *Pasteurella pseudotuberculosis* se diferencian y clasifican netamente de las otras, por una serie de características culturales, biológicas y patogénicas.

Dejamos constancia de la importancia que tiene el uso de azúcares ópticamente activos para el estudio de la fermentación; el hecho de que la mayoría de los trabajos sobre fermentación de azúcares en Pasteurellas, consignen como negativa la fermentación de la arabinosa, explicárase por la razón de no haber usado azúcares ópticamente activos.

De acuerdo a nuestras conclusiones, adoptamos la clasificación de los autores brasileños, teniendo en cuenta las variaciones en la fermentación de la xilosa.

#### CLAVE DE LAS ESPECIES DEL GENERO PASTEURELLA

L) Crece en medios comunes; crece en leche.

A) Inmóvil. No flagelada. No altera ni acidifica la leche. Sin coágulo.

1) Da Indol é SH<sub>2</sub>. No crece en bilis. Fermenta la d-sorbita.

a) Fermenta la l-arabinosa. No fermenta la d-arabinosa. Fermenta la d- y l-xilosa. *Pasteurella Gamaloiae*.

aa) No fermenta d- y l- arabinosa. No fermenta d- y l-xilosa *Pasteurella Bollingeri*.

El resto de la clasificación corresponde a *Pasteurella pestis* y *Pasteurella pseudotuberculosis*, que no nos interesan en este trabajo por ser bien neta su diferenciación.

#### RESUMEN

1º — Damos las bases para un estudio de ciertos caracteres culturales de las Pasteurellas, que permitan nue-

vos datos, para una clasificación menos arbitraria que la actual clasificación por especies.

2º — Aislamos diez cepas de Pasteurellas y damos sus caracteres.

3º — Tomando dichas cepas y las cepas de Pasteurellas de la colección del Instituto Bacteriológico "Malbrán" (cuarenta y siete cepas de mamíferos, siete cepas de aves, una cepa de peste y tres cepas de *Pasteurella pseudotuberculosis*), estudiamos la fermentación de la d- y l-arabinosa y de la d- y l-xilosa.

4º — Ratificamos las conclusiones de los investigadores brasileños Rangel Pestana y Ettore Rugai, respecto a la fermentación de dichos azúcares por las cepas de Pasteurellas de mamíferos, constatando que:

95,78 % de las Pasteurellas de mamíferos no fermentan l- y d-arabinosa.

85,10 % de las Pasteurellas de mamíferos no fermentan l- y d-xilosa.

5º — Rectificamos los resultados sobre fermentación de dichos azúcares por Pasteurellas de aves, no hallando nosotros la coincidencia destacada por los autores anteriormente mencionados de que: "cuando la *Pasteurella* ha fermentado la l-arabinosa no ha fermentado la d-xilosa", sino que por el contrario nuestras observaciones nos dan:

100,00 % de Pasteurellas aviarias no fermentan l-arabinosa.

37,50 % de Pasteurellas aviarias fermentan la l-arabinosa.

100,00 % de Pasteurellas aviarias fermentan la d- y la l-xilosa.

Es decir que el comportamiento de las cepas frente a la l-arabinosa es igual al comportamiento frente a la d- y l-xilosa.

6º — Consideramos estas conclusiones como base para una ulterior clasificación de las Pasteurellas, ya enunciada por Rangel Pestana y Ettore Rugai, en:

<i>Pasteurella Gamaleiae</i>	{ Fermenta l-arabinosa.
	{ No fermenta d-arabinosa.
	{ Fermenta l- y d-xilosa.

<i>Pasteurella Bollingeri</i>	{ No fermenta l- y d-arabinosa.
	{ No fermenta l- y d-xilosa.

7º — Esta comunicación forma parte de un trabajo general sobre clasificación de Pasteurellas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) TOPLEY WILSON. — *Pasteurella*. Capítulo 29. Ed. 1942.
- 2) URIARTE, L., MORALES VILLAZÓN, N. — *Rev. Inst. Malbrán*. Vol. 7, Año 1935.
- 3) SAVINO - ALDAO - ANCHEZAR. — *Rev. Inst. Malbrán*. Vol. 9. Diciembre de 1939.
- 4) SAVINO - MORALES VILLAZÓN - ANCHEZAR. — *Rev. Inst. Malbrán*. Vol. 9. Diciembre 1939.
- 5) RANGEL PESTAÑA, B. y ETTORE RUGAI. — *Rev. dei Inst. Adolfo Lutz*. Vol. 13. Núm. 1. Agosto 1943.
- 6) ROSEMBUSCH, C. y MARCHANT, A. — *Journ. of Bact.* Núm. 37. Año 1938.
- 7) BRIGHAM, G. y RATTGER, L. — *Jour. of infect. dise.* Año 1935.
- 8) LAL, R. B. — *Amer. Jour. of Hyg.* Vol. 17. Año 1927.
- 9) MAJOR ANDERSON, A. P. — Assistant COOMBES. — *The Ind. Jour. of Amer. Rese.* Vol. 17. Año 1929-30.
- 10) CORNELIUS, J. *The Journ. of Patho. and Bact.* Año 1929.
- 11) MAGALHAES, O. DE y ROCHA ADYR. — *Memorias del Instituto B. Ezequiel Díaz*. Tomo 3 y 4. Año 1939 y 1940.
- 12) MORCH, J. R., KROG - LUND. — *Compte Rendu Soc. Biol.* Tomo 105. Año 1930.
- 13) TEISSER - CASTINEL - REILLY y RIVALIER. — *Jour. of Pat.* Año 1922.
- 14) SOSA, H. — *Rev. Inst. Malbrán*. Vol. 9. Septiembre de 1940.
- 15) URIARTE, L. - MORALES VILLAZÓN, N. — *Rev. Inst. Malbrán*. Vol. 18. Noviembre 1936.
- 16) CAMBERLAND y JOUAN — *Ann. Inst. Pasteur*. Tomo 20. Año 1906.
- 17) KRUIF, P. H. DE. — *Jour. Exp. Med.* Tomo 33. Año 1921.
- 18) TANAKA, A. — *Jour. Infect. Dise.* Tomo 38. Año 1926.
- 19) WERSTER, L. T. y BURN, C. G. — *Jour. Exp. Med.* Tomo 44, Año 1926.
- 20) YUSEF, H. S. — *Jour. of ath. and Bact.* Tomo 41.