

# Folia Biologica

Publicación del personal técnico del Instituto Bacteriológico  
del Departamento Nacional de Higiene

Dirección y Administración: VELEZ SARFIELD 563

---

Folia Biol. - Buenos Aires, Set. - Oct. - Nov. - Dic. 1934 - N<sup>os</sup> 42-43-44-45

---

## TRABAJOS ORIGINALES

### Valor diagnóstico de las reacciones de aglutinación en fiebre tifoidea

Por HECTOR SOSA

Desde que WIDAL aplicara al diagnóstico de la tifoidea la reacción de aglutinación conocida por su nombre, son muchas y contradictorias las opiniones sobre su valor en la clínica. Al entusiasmo del primer momento se opuso la alarma de quienes vieron razón de invalidez en las falsas reacciones, que aumentaron considerablemente con la práctica y difusión de la vacunación antitífica.

Por fortuna, la aplicación de las adquisiciones hechas por la bacteriología e inmunología da a la investigación de aglutininas para la bacteria de EBERTH, siguiendo naturalmente técnicas diferentes de la utilizada por WIDAL, un valor diagnóstico extraordinario. Las posibles causas de error son bien conocidas, así como la forma de evitarlas, y puede llevarse el examen hasta convertirlo en un verdadero análisis y dosaje de anticuerpos que nos permite tener idea clara de los antígenos causales y su relación con la enfermedad.

Puede afirmarse, en síntesis, que el valor de una reacción de aglutinación en el diagnóstico de la fiebre tifoidea depende de la aplicación correcta de ciertos principios fundamentales, de la exactitud de la técnica, y de la naturaleza y estado de los antígenos empleados en la reacción y, como es natural, de la interpretación precisa de los resultados.

A medida que en el curso de los años, por la aplicación de conquistas de la investigación, se ha depurado la técnica para el estudio de los sueros remitidos al Instituto Bacteriológico, hemos visto que la reacción adquiría el valor que más arriba le asignamos. Con la elección de las cepas y por revisión y conservación de sus propiedades antigénicas, las llamadas reacciones de grupo desaparecieron o quedaron reducidas a títulos muy pequeños que no molestan la lectura. Cuando observáramos títulos altos para gérmenes antigénicamente distintos, el análisis de anticuerpos siempre nos ha permitido encontrar la causa de esta aparente anomalía, no hallando tampoco dificultades en la diferenciación de las aglutininas debidas a vacunación.

La seguridad adquirida nos llevó a examinar sistemáticamente los sueros remitidos para investigación de brucelosis que dieran reacción de HUDDLESON negativa, y esto nos ha permitido poner en evidencia la existencia de gran cantidad de tifoideas que por su presentación atípica escapaban al diagnóstico clínico\*.

---

\* En ausencia de reacciones positivas para el grupo entérico o para Brucella, el laboratorio es auxiliar inestimable para el hallazgo de casos de tifus exantemático (especialmente cuando se trata de la forma endémica). Recordaré el caso de un peón del puerto de Bs. As. que padeciendo una enfermedad febril aguda quedó sin diagnóstico hasta que se supo el resultado del laboratorio. La prueba no fué solicitada por el clínico.

Pero para llegar a estos resultados es condición indispensable olvidar la mala práctica de sentenciar a un suero « positivo » o « negativo » por la simple observación de lo que ocurre al ponerlo en presencia del bacilo de EBERTH. Bajo el punto de vista de la aglutinación la *Eberthella typhi* debe ser considerada como un complejo antigénico cuyos constituyentes tienen características especiales: generan en el curso de la enfermedad las correspondientes aglutininas, y con distinta celeridad; tienen relación de especificidad con antígenos de otras bacterias, y son susceptibles de sufrir variación. La presencia de aglutininas correspondientes a cada antígeno parcial de *E. typhi* tiene significado distinto; algunas pueden ser generadas por otras bacterias, otras por la vacunación antitífica y otras por la enfermedad.

Vemos que el problema de la aglutinación está íntimamente ligado con el de constitución antigénica de las bacterias. Su buen conocimiento y el de los fenómenos de variación antigénica nos libran de muchos errores y ponen en nuestras manos los elementos para el examen correcto y para la apreciación de los resultados. Insistiremos, por lo tanto, en lo que más se relaciona con nuestro tema, tratando de depurarlo de las complejidades que hacen difícil su comprensión.

### I. — DEL SUERO DEL ENFERMO.

Es corriente afirmar que las aglutininas gozan de gran estabilidad al calor, que resisten la putrefacción y la acción destructiva de diversos agentes. En efecto, para hacer desaparecer totalmente las aglutininas de un suero correspondiente a la forma completa de *E. typhi* es necesario mantenerlo a temperaturas que nunca llega a sufrir en la práctica. Pero esto no quiere decir que un suero no sea alterado por influencias aparentemente menores.

Los gérmenes ciliados contienen distintos tipos de antígenos y generan sus correspondientes anticuerpos, los que tienen propiedades diferentes, habiendo aglutininas estables y lábiles. Como la ejecución correcta de la reacción exige que se titule cada una de ellas es preciso conservarlas.

La sangre debe ser, recogida asépticamente en recipiente estéril, coagulada espontáneamente, y el suero, cuidadosamente decantado, conservado (sin agregado de antisépticos) al abrigo de la luz y el calor.

Para mantener un suero inalterado por largo tiempo, como sería el caso de un suero « test » para el contralor de antígenos, debe ser guardado seco, a baja temperatura y en la obscuridad, en ampollas cerradas al vacío.

### II. — DE LAS SUSPENSIONES DE BACTERIAS (ANTIGENOS).

Las aglutininas se pueden poner en evidencia con bacilos vivos o muertos. En el primer caso se obtiene mayor sensibilidad pero los resultados son inconstantes si no se toman ciertas precauciones, pues en los cultivos es fácil observar variaciones que requieren una atención constante. No basta conservar una cepa in-contaminada, sino también deben mantenerse sus características antigénicas. Las suspensiones de gérmenes muertos pierden parte de su aglutinabilidad rápidamente en un principio y después se estabilizan lo suficientemente como para no necesitar un contralor más que de tiempo en tiempo, variable con el tipo de conservador. Calculando esta pérdida de aglutinabilidad pueden confeccionarse tablas de corrección para la lectura del título de la reacción (Dreyer). Otra ventaja de las suspensiones estabilizadas es que facilitan la distribución del mismo número de gérmenes en cada ensayo.

Hay autores que aconsejan preparar con cierta anterioridad una suspensión y titularla por comparación con otra ya estabilizada y bien conocida, pero, es más correcto titular las suspensiones con un suero « test » conservado con las precauciones de que ya hemos hablado, tal como se hace para la medición de las toxinas destinadas a valorar sueros antitóxicos.

Como las variaciones de aglutinabilidad que puede sufrir un germen del grupo Salmonella (decimos Salmonella en el sentido serológico de BRUCE WHITE) pueden ser de distinto orden y radicar en el total o una de las fracciones antigénicas, trataremos el tema mientras hacemos un resumen rápido sobre los aglutinógenos de las bacterias ciliadas especialmente referido a *E. typhi*.

A) *Antígenos O y H (somático y flagelar)*. — Debemos a SMITH y REACH (1903) la diferenciación de las aglutinaciones somática y flagelar, siendo WEIL y FELIX (1917) quienes demostraron su importancia en interesantes estudios sobre la aglutinación del *B. proteus* X19 con suero de enfermos de tifus exantemático. Recordamos esto para explicar las denominaciones «H» y «O». WEIL y FELIX encontraron dos tipos de colonias en cultivos X19, una que invadía el medio en película —Hauch— y otra que no la formaba —ohne Hauch—; por contracción, «H» y «O». La forma «H» era móvil y ciliada, y la forma «O», inmóvil y sin cilias. Experiencias de absorción con los sueros correspondientes a ambas formas demostraron la existencia de dos antígenos: uno especial de la forma «H», característico del aparato ciliar, que se denominó antígeno H, y el otro, común a las dos formas, el antígeno somático O, al que se debe la aglutinación del *B. proteus* X19 con suero de enfermo de tifus exantemático.

En todas las bacterias ciliadas se pueden distinguir estos dos tipos de antígenos: ciliar (H) y somático (O). La afirmación de que estos antígenos corresponden respectivamente a las cilias (H) y al cuerpo de la bacteria (O) se deduce de las siguientes experiencias:

1° Las bacterias que no poseen cilias solo reaccionan con el anticuerpo somático (O), lo generan al ser inyectadas al animal, y lo absorben de un suero completo dejando intactas las aglutininas H.

2° Las bacterias ciliadas generan, absorben y reaccionan con los dos tipos de aglutininas, H y O.

3° Si por cualquier medio se destruyen las cilias de una bacteria ésta se comporta como las formas «O» de WEIL y FELIX (ohne Hauch).

4° Las cilias aisladas del germen solo reaccionan con el anticuerpo H, y al ser inyectadas al animal se obtiene un suero que no aglutina las formas «O» y solo es activo para los elementos ciliados.

5° Observando bajo el microscopio la acción de las dos aglutininas sobre el germen móvil se ven estos dos aspectos distintos:  $\alpha$ ) Con la aglutinina H los bacilos pierden rápidamente su movilidad y se agrupan sin que los cuerpos bacilares se pongan en contacto, quedando como enredados en la malla formada por las cilias aglutinadas.  $\beta$ ) Por la acción de la aglutinina O los bacilos se adhieren por sus cuerpos, en forma compacta y sin perder su movilidad; observándose grumos que giran bajo el impulso de las cilias.

B) *Variación cuantitativa. Inaglutinabilidad*. — Es bastante común que una cepa de *E. typhi* recién aislada del enfermo presente el fenómeno de inaglutinabilidad en los primeros subcultivos. Los gérmenes inaglutinables son capaces de producir aglutininas al ser inoculados al conejo y hasta de absorberlas al ser puestos en presencia de un suero aglutinante, pero, la formación de grumos, segunda fase del mecanismo de la aglutinación, no se produce.

MALVOZ (1897) asociaba la falta de aglutinabilidad con la ausencia de movilidad y FELIX (1924) y otros creen que puede ser debida a pérdida o alteración del receptor termolábil (H).

Hechos interesantes relacionados con el fenómeno aunque no constituyan una explicación son: 1° Al calentar una suspensión de bacilos a temperaturas relativamente bajas se nota una pérdida de aglutinabilidad que vuelve a aparecer aumentando la temperatura. 2° Si destruimos progresivamente un antígeno lo primero en desaparecer es la propiedad de aglutinarse, después la de absorber aglutininas, y por último, la de comportarse como generador de anticuerpos. El primer caso puede ser debido a un fenómeno de inhibición, y el segundo a la

cantidad de antígeno remanente, pues sabemos que la proporción necesaria para generar anticuerpos, absorberlos y absorberlos con floculación aumenta en el orden enunciado.

La aglutinabilidad de un germen está sujeta a grandes variaciones. Es distinta según el medio empleado para el cultivo: p. ej., los cultivos en caldo son más sensibles que en agar. La temperatura de incubación la modifica: p. ej., NICOLLE y TRENELL (1902) encontraron una cepa de *E. typhi* que era inmóvil e inaglutinable cuando desarrollaba a 37° y móvil y aglutinable cultivada a temperatura ambiente. Influyen también el pH y la concentración de electrolitos. Pero, las más graves alteraciones son debidas a la irregularidad y poco cuidado en el pasaje de las cepas.

C) *Variación cualitativa del antígeno somático. Variación S-R. Autoaglutinación.* — Cuando las suspensiones de las bacterias de este grupo se aglutinan espontáneamente no deben ser utilizadas para la reacción aunque la lectura no esté dificultada. La autoaglutinabilidad es indicio, en estos gérmenes, de una alteración del antígeno somático; la alteración R.

Entre la variedad de colonias de *E. typhi* observadas por BAERTHLEIN (1912) y por autores antiguos hay algunas que corresponden a las denominadas por ARKWRIGHT «R» y «S». Las colonias «R» fueron descritas como más o menos dentadas, menos elevadas que las normales, con superficie irregular, áspera o mate y ligeramente opacas, en contraposición a la colonia normal o «S» que es redonda, en cúpula y traslúcida. Las letras R y S con que se designan los dos tipos de colonias provienen de las palabras inglesas «rough» y «smooth», bien expresivas por cierto.

La forma «S» es la normal, observada en el aislamiento directo de la sangre, órganos o heces del hombre.

La «R» cultivada en agar conserva el aspecto tosco con superficie deslustada. En caldo desarrolla en grumos, enturbiando poco, formando depósito abundante y a veces una película frágil. Las suspensiones en solución fisiológica aglutinan espontáneamente y cuando son muy concentradas reaccionan con el reactivo de MILLON en rojo clavel.

La variación «R» no siempre se presenta en la forma característica que hemos descrito. La alteración puede no ser tan completa y presentar aspectos intermedios en que la sensibilidad a los electrolitos es menor, pero, como ella significa una deformación antigénica, debe cuidarse de no utilizar formas «R», aunque sean parciales, para el diagnóstico serológico.

La alteración antigénica de las formas «R» radica exclusivamente en la porción somática del bacilo, está ligada a modificación en cantidad de lípidos e hidrocarbonado, y se caracteriza por un antígeno especial,  $\phi$ , que SCHÜRZE (1921) llamó cosmopolita por ser común en todas las formas «R» de las bacterias del grupo\*.

La comunidad antigénica de las formas «R» y el hecho de ser sensibles a los sueros normales obliga a excluirlas y no utilizarlas en la reacción.

ARKWRIGHT y GOYLE (1924) pretendieron relacionar las formas «Smooth» y «Rough» con las «O» y «H» de WEIL y FELIX. Este error ha sido reconocido pero, como muchos autores no lo han comprendido y confunden estas denominaciones, dificultando la interpretación de sus trabajos, insistimos en representar esquemáticamente estos dos tipos distintos de variación. Uno que se refiere a la presencia de cilias y el otro, ajeno al aparato locomotor, que indica solamente cambios antigénicos en el cuerpo de la bacteria.

Formas «H» y «O» significan: «H», germen ciliado; «O», sin cilias. (H, antígeno ciliar, y O, antígeno somático).

La transformación «S»-«R», que es una alteración somática, puede ocurrir

\* El antígeno  $\phi$  es común a las formas «R» de *E. typhi* y de todas las Salmonellas.

en elementos móviles o inmóviles: es decir «H» y «O»: de donde podemos distinguir los tipos «H-S», «H-R», «O-S» y «O-R».

«S» móvil — «H-S» — contiene antígenos H y O.

«S» inmóvil — «O-S» — contiene solo antígeno O.

«R» móvil — «H-R» — contiene H y  $\emptyset$  (O alterado).

«R» inmóvil — «O-R» — solo contiene antígeno  $\emptyset$  (O alterado).

En las formas intermedias pueden coexistir los antígenos O y  $\emptyset$  en el mismo elemento, ligado o no al antígeno H.

Los trabajos en que se pretende clasificar serológicamente los gérmenes del grupo EBERTH-SALMONELLAS sin tener en cuenta la alteración «R» no tienen valor en lo que se refiere al estudio de los antígenos somáticos.

D) *Variación cualitativa del antígeno ciliar. Oscilación de fase.* — La inespecificidad específica de algunos tipos de Salmonellas hizo considerar a los cultivos de laboratorio como una colección heterogénea de unidades que presentaban todas las gradaciones alternativas de especificidad. El primer paso dado hacia la comprensión de estas variaciones fué dado por ANDREWES (1922) que examinando placas de aislamiento de cultivos de bacilos paratífico B. suipestifer aertryck, newport y C de HIRSCHFELD, encontró dos tipos de colonias diferenciables serológicamente que llamó, específicas y no-específicas (o «group»). Los gérmenes de las colonias específicas y sus primeros subcultivos aglutinaban solo con el suero correspondiente, mientras que los de las colonias no-específicas reaccionaban intensamente con los sueros de los otros tipos, especialmente con los no-específicos. De una colonia específica se podían obtener, por pasajes, tipos no-específicos y viceversa.

Esta oscilación de especificidad que WHITE llamó variación de fase (phase variation) puede cumplirse en tiempos variables. Dos o tres pasajes pueden ser suficientes, por lo general 8 ó 10 y algunas cepas no varían en 20 ó 30 subcultivos. No está ligada a modificación en el aspecto de la colonia o del bacilo; solo afecta al antígeno ciliar (H), dejando invariable el somático (O), y puede observarse tanto en las formas «R» como «S».

La variación de fase nunca es completa. Las formas específicas siempre contienen algo de antígeno no-específico y a la inversa, las no-específicas contienen factor específico. Pero el residuo específico de la fase no-específica siempre es mayor que el no-específico en la fase específica. Parece existir un predominio del factor específico y es así que es más fácil obtener la forma específica de una no específica que la inversa.

La variación de fase del antígeno ciliar solo se observa en algunos gérmenes del grupo, entre los que se encuentran el paratífico B y el C de HIRSCHFELD, que se denominan por esta razón, difásicos. La *E. typhi* y el paratífico A pertenecen a la serie de los monofásicos, es decir, que no presentan variación de fase. El término meta-salmonellas se aplica a los tipos, como *Pullorum* y *Sanguinarium*, agentes de infección en las aves, que no poseen cilias y por lo tanto carecen de antígeno H.

E) *Relaciones antigénicas entre las bacterias del grupo Salmonella.* — Además del antígeno común de las formas «R», el antígeno  $\emptyset$ , que caracteriza las formas «R» de todos los gérmenes del grupo en su porción somática, las salmonellas en su forma «S» se relacionan serológicamente por antígenos que pueden estar radicados en el aparato ciliar o en el soma de la bacteria.

La distribución de los antígenos de las formas «S» está representada en el cuadro que copiamos del trabajo de BRUCE WHITE (*Medical Research Council. Special Report Series* nº 103, 1926, p. 132), completado con algunos datos del publicado en *System of Bacteriology* (1929, vol. IV, p. 115). Vemos: que el antígeno de mayor amplitud de enlace es el ciliar no específico, común en toda la serie difásica e idéntico por lo menos en el factor G, y común con los antígenos ciliares de las cepas Binns y suipestifer europeo que son tipos monofási-

cos con características no-específicas; que gran parte de los tipos difásicos en su fase específica tienen comunidad antigénica, parcial o total, con antígenos ciliares de tipos monofásicos; y que la relación de los antígenos somáticos es ajena a la clasificación por alteración de fase\*.

El bacilo de EBERTH, bajo el punto de vista serológico, puede ser considerado como una Salmonella y por lo tanto ha sido incluido. En su forma «R» se comporta como todas las formas «R» del grupo y, libre de esa alteración (forma «S»), tiene un componente somático III común con las cepas Enteritidis de Gaertner, Pullorum, Sanguinarium, Moscow, Dublin, Dar-es-Salaam y Tokyo, además de sus relaciones por el componente somático menor 7, y su antígeno ciliar es común con los ciliares específicos de los tipos difásicos STANLEY y Bombay.

El factor somático X es considerado como inconstante por B. WHITE pero, como la mayor parte de las cepas EBERTH por él estudiadas eran de colección, es probable que hayan sufrido alteración, por lo que es de desear se investigue su presencia en cepas recién aisladas.

A primera vista parecería que la relación antigénica de *E. typhi* con el grupo Salmonella introduce enormes dificultades en la investigación de las aglutininas de un tifoideo. Como veremos después, éstas se salvan fácilmente y, bajo ciertas condiciones, puede utilizarse la comunidad antigénica parcial de algunas Salmonellas para titular cada uno de los anticuerpos correspondientes a *E. typhi*.

### III. — INTERPRETACION DE LA PRESENCIA DE AGLUTININAS PARCIALES PARA *E. TYPHI*. — AGLUTINACION EN VACUNADOS.

Si consideramos solo los antígenos principales y constantes, la *E. typhi* está constituida por el somático III y el ciliar S\*\*. Debe exigirse la presencia de los anticuerpos correspondientes a estos dos antígenos para hacer diagnóstico serológico de tifoidea.

Si solo se encuentran aglutininas para uno de ellos debe tenerse en cuenta que:

1º La vacunación antitífica genera en el hombre solamente\*\*\* anticuerpos ciliares y si bien éstos desaparecen, generalmente en tiempo relativamente corto, las aglutininas pueden reaparecer bajo la acción de estímulos no específicos. (Reacción anamnésica en vacunados).

2º La presencia de aglutininas somáticas III puede ser debida a una infección por otro germen del grupo Salmonella con ese antígeno estable, especialmente el grupo Enteritidis (*S. enteritidis* y sus variedades), o ser manifestación de una tifoidea en su comienzo; pues las aglutininas somáticas son más precoces en aparecer en el curso de la enfermedad.

Estos conceptos son la clave con que hemos desarrollado la técnica que exponemos, que no es más que la aplicación coordinada de dos métodos conocidos tomando como base principal lo que sabemos de constitución antigénica de las salmonellas.

Hay autores que, no encontrando otra solución posible al problema que la basada en la mayor o menor persistencia de las aglutininas debidas a vacunación, titulan el valor aglutinante del suero de sujetos que han sido vacunados meses o años antes, y pretenden sacar conclusiones para basar en ellas su opinión sobre el

\* La Sociedad Internacional de Microbiología designó una comisión constituida por P. BRUCE WHITE, W. M. SCOTT, H. SCHÜTZE, F. KAUFFMANN, E. O. JORDAN, R. ST. JOHN BROOKS y K. AOKI, para el estudio del grupo Salmonella, habiendo llegado a un acuerdo, del que da cuenta parcialmente un trabajo de F. KAUFFMANN en el que figuran 44 especies o variedades diferenciables por su estructura antigénica, por su comportamiento cultural o por ambos, siendo en general la base de la diferenciación antigénica la utilizada por BRUCE WHITE.

\*\* No confundir con la designación «S» de las formas «Smooth».

\*\*\* En ciertos casos de vacunación muy reciente se encuentra algo de aglutinina somática pero, a un título inferior al que se exige para diagnóstico.



Dos métodos han sido propuestos para diferenciar las aglutininas de vacunación de las producidas por enfermedad: la apreciación de aglutininas granulares de FELIX y la obtención de curvas por titulaciones repetidas en cortos intervalos.

FELIX (1924) dice, que si al practicar la reacción se observa aglutininas de copos pequeños, granulares, al mismo tiempo que los copos grandes, puede hacerse diagnóstico de infección, pues estas aglutininas granulares no se producen en vacunados. Los copos de aglutinación —H—, ciliar, se disgregan muy fácilmente y agitando el tubo quedan solamente los gránulos de aglutinación somática.

La presencia de gránulos significa que hay aglutininas para la porción somática de *E. typhi*, pero no asegura que sea éste el agente infectante: solo indica que hay infección por un germen con antígeno somático común. Ya DAWSON (1915) había observado que el suero de vacunado no aglutinaba el bacilo de GAERTNER, y propuso este ensayo para diferenciar el suero del enfermo que lo aglutina. Pero la presencia de aglutininas granulares y la aglutinación de *S. enteritidis* de GAERTNER solo demuestran que hay anticuerpos que no son debidos a vacunación; puede tratarse de una infección a un germen del grupo Enteritidis.

El método de las curvas se basa en la obtención de gráficos por titulaciones repetidas con bacilos tíficos, y paratíficos A y B. En una tifoidea, las aglutininas por vacunación pueden elevarse rápidamente para volver a decaer mientras las de *E. typhi* continúan su ascenso. Si la infección es a un paratífico, la aglutinina correspondiente destaca su curva sobre las otras. Los resultados obtenidos no siempre son claros.

Estos dos métodos que por separado no aseguran la exactitud del diagnóstico, utilizados simultáneamente y teniendo en cuenta la relación antigénica de las salmonelas, permiten señalar el agente infectante.

A la apreciación de la aglutinación granular preferimos, como más exacto, la titulación con antígeno somático puro.

Si un suero no aglutina a *E. typhi* y paratíficos completos el resultado de la reacción debe considerarse negativo, siempre que no se trate de un caso de reciente comienzo en que hay que repetir el examen en periodo de producción de aglutininas.

Si solo se encuentran aglutininas somáticas para *E. typhi*, anotamos reacción positiva con antígeno —III—, e investigamos aglutininas ciliares para probables agentes de infección con ese antígeno; especialmente la *S. enteritidis* y variedades. En esta forma se elimina un error posible. Si los resultados son negativos debe repetirse el examen con tres días de intervalo y esperar la aparición de aglutininas ciliares antes de hacer diagnóstico. Es posible que la investigación de anticuerpos para el antígeno somático inconstante de *E. typhi*, el factor —X— de WHITE, pueda dar luz en estos casos indicando infección a bacilo de EBERTH.

La presencia de aglutininas ciliares para *E. typhi* sin la reacción somática correspondiente no indica tifoidea en evolución. Como el error por relación antigénica es muy poco probable debe considerarse que son aglutininas por vacunación o que puede tratarse de un sujeto que ha padecido tifoidea tiempo antes, puesto que las aglutininas somáticas desaparecen mucho más rápidamente que las ciliares después de la curación.

En los vacunados, como es de práctica inmunizar con paratíficos A y B al mismo tiempo que con *E. typhi*, se encuentran aglutininas ciliares para los tres. El título difiere entre ellos y hasta puede faltar para alguno, especialmente para el paratífico A. Cuando se encuentran aglutininas ciliares para estos gérmenes (*E. A* y *B*) o para dos de ellos debe deducirse que se trata de título residual por vacunación o reacción anamnésica en vacunado.

En el caso de tifoidea en vacunado el estudio de la evolución de las aglutininas tiene más importancia, pero no es suficiente notar que el título para *E. typhi* se destaca de los otros, hay que corroborar esta observación con la demostración

de aglutininas somáticas —III—. Cuando un vacunado adquiere una tifoidea se observa un aumento de las aglutininas residuales que por lo general es mayor (no siempre) para el germen infectante, pero como otras enfermedades pueden provocar la exaltación de los anticuerpos de vacunación y las curvas no siempre se superponen, es necesario constatar la presencia del anticuerpo somático correspondiente.

Cuando se observan aglutininas somáticas —III— en un vacunado debe descartarse una posible infección por *S. enteritidis* investigando reacción H para cepa GAERTNER.

En resumen:

Eberth O (= GAERTNER O) . . .	Tifoidea o Infección a <i>S. enteritidis</i> y var. en su comienzo.
Eberth O (= GAERTNER O) . . .	} Infección a <i>S. enteritidis</i> y var.
Gaertner H . . . . .	
Eberth O . . . . .	} Tifoidea.
Eberth H . . . . .	
Eberth H . . . . .	Vacunado o ha padecido tifoidea.
* Eberth H . . . . .	} Vacunado E. A. B.
* Paratífico A. H . . . . .	
* Paratífico B. H . . . . .	
Eberth H . . . . .	} Tifoidea en vacunado.
Eberth O . . . . .	
* Paratífico A. H . . . . .	
* Paratífico B. H . . . . .	
Sin aglutininas ciliares GAERTNER. ]	

Como estas investigaciones se hacen teniendo en cuenta el período de evolución de la enfermedad, el laboratorista debe conocer la historia clínica del caso para su mejor desempeño.

Tratándose de paratifoideas se utiliza la misma técnica considerando que la relación antigénica es distinta. En paratifoidea A las condiciones son más simples que en tifoidea. Más delicado es el ensayo de aglutininas en casos de infección a gérmenes con variación de fase de Andrewes, en que hay que considerarla investigando los anticuerpos para las dos fases y exigir, para hacer diagnóstico, la presencia de aglutinina de fase específica que siempre se encuentra en el enfermo.

IV. — ALGUNOS DETALLES DE TECNICA.

Dijimos que la reacción se podía practicar con gérmenes vivos o muertos. Por las razones ya expresadas y para disminuir los peligros de contaminación, es preferible utilizar suspensiones de gérmenes muertos, perfectamente tituladas en el sentido de su aglutinabilidad y caracteres específicos.

Para poder comparar los resultados es indispensable trabajar siempre en igualdad de condiciones. La cantidad de gérmenes que intervienen en la reacción debe ser la misma, pues influye en el título. Lo mismo debemos decir del tiempo y temperatura de reacción.

El óptimo de temperatura es de 50°, no debiendo sobrepasarse los 52°. Temperaturas un poco más altas aceleran algo la reacción pero hacen correr el riesgo de desvirtuar los resultados por destrucción parcial del antígeno ciliar o del anticuerpo somático. Los mejores resultados se obtienen con una permanencia de dos horas en baño-maría a 50° y 18 horas a temperatura ambiente antes de la lectura. Es posible acelerar la reacción. Estamos trabajando en ese sentido desde

\* Las aglutininas ciliares para estas especies no se encuentran constantemente.

hace unos años, con muy buenos resultados, tratando de poner en las manos del práctico un método rápido y sencillo pero, como aún no consideramos terminada la investigación, solo nos referiremos más adelante a la llamada aglutinación macroscópica, practicada en tubos de ensayo con volumen constante de líquido.

Es mala práctica diluir el suero con la suspensión de gérmenes. El suero se diluye con solución de ClNa isotónica y después se agrega el antígeno; lo que puede hacerse en dos formas prácticas:

1ª En una serie de tubos se distribuye 1 cm<sup>3</sup> de suero diluido a los títulos deseados (p. ej. 1/50, 1/100, 1/200, etc.) y con una pipeta de punta calibrada se agrega a cada tubo una gota de una suspensión conteniendo 2500 millones de bacilos.

2ª Se coloca en cada tubo 0.5 cm<sup>3</sup> de la dilución del suero a doble concentración que el título deseado (p. ej. 1/25 para obtener 1/50) y se agrega a cada tubo 0.5 cm<sup>3</sup> de suspensión bacilar con 5000 millones por cm<sup>3</sup> para obtener una proporción final de 2500 millones por cm<sup>3</sup>.

No hay ningún interés en hacer diluciones del suero con poca variación entre ellas, porque no se pueden sacar conclusiones por pequeñas diferencias en el título. Nosotros acostumbramos investigar aglutininas (salvo excepciones) a partir de 1/25, doblando el título hasta 1/800.

Insistimos en que bajo ningún concepto se utilizarán cepas con indicios de alteración « R »; (suspensiones con tendencia a la autoaglutinación, gérmenes que no dan cultivos completamente uniformes en caldo, sensibles a los electrolitos y a sueros normales o sueros R sin anticuerpos H); de manera que pasaremos por alto las técnicas especiales para el estudio serológico de éstas.

Los cultivos destinados para la reacción exigen una vigilancia constante. Para que no nos pasen desapercibidas pequeñas modificaciones en el aspecto de las colonias recurrimos a un artificio. Practicamos la siembra con alambre delgado de platino al que hemos hecho una pequeña bolita en la punta fundiéndolo por medio de chispa eléctrica o aproximándolo un instante al arco de una lámpara para examen en fondo oscuro. El aislamiento se efectúa tomando material, con la bolita de platino, del centro de la colonia elegida para transportarlo a un tubo de agar inclinado; se punza el agar en el fondo del tubo para quitar el exceso de material y el resto se distribuye frotando el agar con oscilaciones transversales y ascendentes. En esta forma se obtiene en el fondo un cultivo homogéneo que va raleando más arriba, mostrando colonias aisladas desde la mitad del agar. Así pueden distinguirse mínimas alteraciones morfológicas de las colonias observando los tubos después de 24 horas de cultivo y 24 ó 48 a temperatura ambiente. En las resiembras sucesivas, y siempre que no se note nada anormal, se toma material de la porción donde el cultivo es compacto. Cada tanto tiempo y cuando se observa algo sospechoso debe hacerse aislamiento tomando material de colonia aislada, pero siempre que se haga esto hay que controlar el valor antigénico del cultivo obtenido.

Debe tenerse especial cuidado de mantener la característica de fase cuando se toma material de colonia aislada en cepas del grupo difásico. Como la variación de fase no está relacionada con modificaciones en el aspecto de las colonias debe ensayarse la aglutinabilidad de los cultivos obtenidos, con el suero específico correspondiente y con no-específico libres de anticuerpos O por absorción o ligados a anticuerpos somáticos distintos.

Para la investigación de las aglutininas somáticas es conveniente tener suspensiones sin antígenos ciliares. Estas se obtienen por dos vías: por destrucción del antígeno H o por cultivos de gérmenes sin cilias.

El antígeno ciliar puede ser eliminado fácilmente por su labilidad al calor, a los ácidos diluidos, a la desecación y al alcohol. Exponiendo una suspensión de gérmenes a 100° durante 40 minutos pierde el poder de reaccionar frente al

anticuerpo H. Algunas cepas después de este tratamiento pierden aglutinabilidad, por lo que es preferible utilizar el método del alcohol: alcohol absoluto a 56° durante 2 horas, o diluido al tercio en solución fisiológica durante varios días a 37° (Bien).

Pueden obtenerse cultivos de bacilos sin cilias por selección de colonias, o desarrollándolos en agar fenolado de Braun. Con estos procedimientos no siempre se obtienen bacilos completamente libres de antígeno H por lo que es prudente destruirlo, para lo que aconsejamos agregar a la suspensión de gérmenes la mitad de su volumen de alcohol y mantenerlo en recipiente cerrado 5 días en estufa a 37°. Estas suspensiones con 1/3 de alcohol conservan mucho tiempo su valor antigénico-somático.

Para la titulación de las aglutininas ciliares se eliminan primero las aglutininas O por absorción con antígeno somático y se ensaya luego el suero con bacilos completos. No detallaremos la técnica por ser bien conocida, recordando solamente que una bacteria difícilmente absorbe más de diez veces la cantidad de anticuerpo capaz de aglutinarla, de manera que hay que tener en cuenta el título del suero o agregar un exceso de gérmenes.

La relación antigénica del grupo Salmonella nos permite utilizar algunas para la titulación de anticuerpos para *E. typhi*.

Una cepa *Pullorum*, por su comunidad antigénica con el bacilo de EBERTH se presta muy bien para la titulación del anticuerpo somático —III—; no exige preparación por no contener otro antígeno, pero como su aglutinabilidad es menor frente al anticuerpo somático EBERTH hay que buscar la relación de aglutinabilidad para la corrección del título.

Para titular el anticuerpo H de *E. typhi* se puede utilizar una cepa STANLEY en fase específica, siempre que el suero no contenga aglutininas para sus otros factores antigénicos. Prácticamente, un suero que no aglutina al B. paratífico B puede ser ensayado con cepa STANLEY, permitiéndonos eludir la prueba de absorción.

Extendiendo a los agentes de paratifoideas las consideraciones anotadas respecto a la utilización de las salmonellas en el caso de tifoidea, y con el auxilio del cuadro de las relaciones antigénicas, la investigación de cada uno de los anticuerpos de un suero en examen no ofrece mayores dificultades.

#### V. — EJEMPLOS.

Algunos casos que hemos tenido ocasión de estudiar y cuyos protocolos agregamos, pueden servir de valioso ejemplo para ilustrar la importancia de la aplicación de los métodos aconsejados.

5-II-1934. N. N., R. P. Protocolo 28838.

Eberth total . . . . .	Positiva	1/2.500	Pullorum . . . . .	Negativa
Eberth somático . . . . .	Negativa			
Paratífico A total . . . . .	Positiva	1/5.000	Gaertner . . . . .	Negativa
Paratífico A somático . . . . .	Negativa			
Paratífico B total . . . . .	Positiva	1/250	Proteus X19 O . . . . .	Negativa
Paratífico B somático . . . . .	Negativa			

El médico que había pedido la reacción diciéndonos que se trataba de una tifoidea típica sin antecedentes de vacunación nos comunica al día siguiente que estaba en un error al afirmar de que no había sido vacunado, pues, sin su conocimiento, los otros facultativos que atendían al enfermo le había inoculado T. A. B., y sería intervenido por una colección purulenta periuretral. El examen bacteriológico del pus dió cultivo puro de *E. coli*.

2-XII-1933. N. O. Protocolo 27780.

Se nos pide examinar el suero de este enfermo que viene del campo con diagnóstico de tifoidea.

Eberth total . . . . .	Positiva 1/200	Paratífico B total . . .	Positiva 1/200
Eberth somático . . . . .	Negativa	Paratífico B somático . .	Negativa
Paratífico A total . . . . .	Negativa	Pullorum . . . . .	Negativa
		Gaertner . . . . .	Negativa

Este es un ejemplo de reacción anamnésica en vacunado. El enfermo, que padece de una córtico-pleuritis, había sido vacunado 6 años antes durante el servicio militar con gran reacción que lo obligó a guardar cama varios días.

24-IV-1933. P. L.

Se nos remite materia fecal para la investigación de disenterógenos. El resultado es negativo. Mientras estudiamos un bacilo hallado, de difícil colocación en sistemática, pedimos suero del enfermo para ver si contiene anticuerpos para ese germen (F 1).

La reacción de aglutinación para F 1 fué negativa pero encontramos lo siguiente:

	1/50	1/100	1/200	1/400	
F 1 . . . . .	0	0	0	0	
Eberth . . . . .	++++	++++	++++	+++	(H y O)
Paratífico A . . . . .	±	0	0	0	
Paratífico B . . . . .	±	0	0	0	
Pallorum . . . . .	+++	±	0	0	(O)
Gaertner . . . . .	++	+	0	0	(O)

El suero calentado 30' a 66° pierde todas las aglutininas para *Pullorum* y GAERTNER conservando aglutininas EBERTH (H).

La investigación serológica ha permitido aclarar la etiología de una tifoidea con aglutininas completas para *E. typhi*. Al calentar el suero se han destruido, por su labilidad, las aglutininas somáticas III comunes a EBERTH, *Pullorum* y GAERTNER, quedando las correspondientes a las células de *E. typhi*.

9-II-1934. María S. Hosp. Muñiz. Sala IX. cama 8. Protocolo 29004.

Eberth . . . . .	1/250-500	(H y O)
Paratífico A . . . . .	1/10.000	(H)
Paratífico B . . . . .	1/250	(H)

Solo contiene aglutininas completas para *E. typhi*. No contiene aglutininas somáticas para A ni B.

A pesar del título elevado para el paratífico A deducimos que se trata de una tifoidea en sujeto vacunado y nos propusimos, para constatarlo, seguir la curva de producción de aglutininas. Esto no se pudo hacer porque el enfermo falleció el día 12.

De bazo y de úlcera intestinal aislamos *E. typhi*. Diagnóstico clínico: tifoidea: con hemocultivo negativo. Se le hizo T. A. B. con fin terapéutico.

Conseguimos ampollas de la vacuna inoculada al enfermo para experimentarla en animales y tratar de aclarar el porqué del título tan alto para el paratífico A ligado a escasas aglutininas B. Inoculamos conejos por vía subcutánea y endovenosa: practicamos dos inyecciones con cinco días de intervalo y sangramos al décimo día.

Conejo J 447 — vía endovenosa			
Eberth 1/5.000	A 1/5.000	B 1/250	
Conejo J 441 — vía subcutánea			
Eberth 1/2.500	A 1/2.500	B 1/250	

Se constata un valor antigénico bajo de la vacuna para el paratífico B, que explica la diferencia de título A y B en el enfermo. La producción escasa de aglutininas Eberth es común observarla en las formas muy graves de tifoidea.

Este es un caso en que la técnica corriente de investigación de aglutininas habría conducido a error, llevándonos al diagnóstico serológico de paratifoidea A. La búsqueda de aglutininas somáticas nos ha librado de ello y la investigación en animales ha aclarado un punto oscuro debido a la vacuna.

22-II-1934. E. F. Hospital Común Regional de Misiones. Protocolo 29056.

Muestra de sangre remitida para investigación de fiebre ondulante. Reacción de HUDDLESON: negativa:

Eberth . . . . .	Título muy débil (O)	Paratífico B . . . . .	Negativa
Paratífico A . . . . .	Positiva 1/500	Proteus X19 O . . . . .	Negativa
Somático A . . . . .	Negativa		

Estos resultados no permiten hacer diagnóstico por lo que pedimos, telegráficamente, nuevas muestras para estudiar las variaciones de título.

2-III-1934.

Eberth total . . . . .	Positiva 1/500	Paratífico B total . . . . .	Negativa
Eberth somático . . . . .	Positiva 1/500	Pullorum . . . . .	Positiva 1/50
Paratífico A total . . . . .	Positiva 1/500 débil	Gaertner total . . . . .	Positiva 1/25
Parat. A somático . . . . .	Negativa	Gaertner somático . . . . .	Positiva 1/25

Aglutina la fase específica de la cepa STANLEY. Absorbiendo con *E. typhi* no quedan aglutininas para GAERTNER ni para STANLEY (III y S).

Absorbiendo con *Pullorum* y GAERTNER quedan aglutininas somáticas y ciliares para *E. typhi* (X 8 y S).

A pesar del título elevado, pero incompleto (H), para el paratífico A debemos considerar que se trata de una infección a *E. typhi*: 1º Porque el suero contiene aglutininas para todo el complejo antigénico del bacilo de EBERTH. 2º Porque estas aglutininas han sufrido un ascenso marcado en pocos días, mientras el título para el paratífico A (ciliar) ha descendido levemente.

CONCLUSIONES.

La investigación de los anticuerpos aglutinantes del suero de un enfermo permite establecer el diagnóstico diferencial entre infección por *E. typhi* y vacunación con T. A. B.