Estructura del antígeno ciliar de *Listerella monocytogenes* (1)

Por ENRIQUE SAVINO y NESTOR MORALES VILLAZON

Los microorganismos correspondientes a la denominación de *Listerella monocytogenes*, reconocidos como agentes etiológicos de enfermedades del hombre y de los animales, son bacterias ciliadas y móviles. Para la mayor parte de los autores son monótricos y de flagelo polar; sin embargo, MC GAUGHEY (citado por PATERSON 1939), empleando el método de LEIFSON (1930) para la coloración de las ciliias, lo encuentra multiflagelar y peritrico. Esta observación ha sido confirmada por PATERSON (1939), en un mayor número de cepas de *Listerella*. Nosotros hemos podido corroborar esta afirmación utilizando el mismo método arriba citado.

A semejanza de lo que se observa con la *Pasteurella pseudotuberculosis* o con algunos microorganismos del grupo *Coli-anaerogenes*, *Listerella monocytogenes* es una bacteria inmóvil o muy móvil cuando se desarrolla a 37°C, y en cambio es muy móvil si crece a 20-22°C.

Listerella monocytogenes presenta el tipo de aglutinación ciliar, esto es el que se observa cuando se colocan bacterias muy jóvenes, crecidas a 20-22°C, en presencia del suero específico. (2).

I. — ANTECEDENTES

Diversos son los autores que han observado diferencias de carácter antigénico en los microorganismos clasificados como *Listerella monocytogenes*.

(1) Trabajo presentado el 26 de noviembre de 1940, en la Reunión de Comunicaciones del personal del Instituto Bacteriológico.

(2) La aglutinación ciliar junta a las bacterias en grandes grumos. La agitación los deshace con facilidad y de este modo la suspensión bacteriana cobra nuevamente el aspecto homogéneo.

SEASTONE (1935), realizó experimentos de aglutinación con seis cepas de *Listerella*: una de origen cunicular, aislada por MURRAY, WEBB y SWANN (1926) en una epizootia de estos animales; otra de origen humano (BURN, 1934-1935-1936); la tercera de origen bovino (JONES y LITTLE, 1934), dos de oveja y una de gallina, las tres aisladas por TEN BROECK en 1931-1932. SEASTONE encontró que las cepas humanas, bovinas, ovinas y aviar aglutinaban con cualquiera de los sueros, en cambio la cepa de MURRAY, *et al.* aglutinaba únicamente con su mismo suero.

JUNGHERR (1937), al comparar dos cepas de *Listerella monocytogenes* aisladas de encefalitis de oveja con dos humanas de BURN (1934-1935-1936), comprobó que las dos primeras eran antigénicamente idénticas a una de las cepas de BURN, y diferentes de la otra restante.

WEBB y BARBER (1937), estudiaron con idéntica finalidad, las siguientes cepas de *Listerella*: dos de origen cunicular (MURRAY, *et al.* 1926), dos humanas (SCHULTZ, *et al.*, 1933-1934 y GIBSON, 1935), y una de jerbos (PIRIE, 1927). Dichos autores llegaron a la conclusión que la cepa aislada de jerbos era muy semejante, claro está desde el punto de vista antigénico, a una de las originarias de conejo y que la otra cepa cunicular, también de MURRAY, era idéntica a las aisladas en el hombre por SCHULTZ *et al.*, y por GIBSON.

JULIANELLE y PONS (1939), aislaron *Listerella monocytogenes* de la sangre de un paciente con mononucleosis infecciosa y estudiaron su comportamiento suerológico frente a dos cepas humanas (BURN, 1934-1935-1936 y SCHULTZ, *et al.*, 1933-1934 y 1938); dos de origen cunicular (MURRAY, *et al.*, 1936) y tres aisladas por SEASTONE (1935) de animales bovino, ovino y caprino.

PATERSON, más tarde, (1939), publica un trabajo sobre la constitución del antígeno ciliar de *Listerella monocytogenes*. Emplea 27 cepas de diferentes orígenes: una de conejo (MURRAY, *et al.*, 1926); una de jerbo (PIRIE, 1927); cuatro de ovejas (dos de GILL, 1931, 1933 y 1937, y dos de JUNGHERR, 1937); una de cabra (JUNGHERR, 1937); una de bovino (JONES y LITTLE, 1934); una de gallina aislada por TEN BROECK (SEASTONE, 1935); seis de origen humano, de las cuales dos fueron aisladas por NYFELDT de angina monocítica (1929-1932) y las cuatro restantes pertenecen a los casos de SCHULTZ, *et al.*, (1933-1934 y 1938), BURN (1934-1935-1936), GIBSON (1935) y CAREY (1936), y finalmente 12 cepas de gallina, aisladas en Inglaterra, una por MC GAUGHEY, cuatro por C. V. WATKINS y siete por PATERSON (1937). PATERSON efectúa su estudio sobre la composición ciliar de *Listerella monocytogenes* empleando el método de absorción de aglutininas. De acuerdo a los resultados clasifica estas veintisiete

te cepas en tres grupos. El grupo 1: de estructura ciliar: AB; el grupo 2: ABC; el grupo 3: BD. En el primer grupo incluye todas las cepas de gallina aisladas en Inglaterra (menos una de ellas la cepa L S/13), las de MURRAY, *et al.*, PIRIE, NYFELDT y SCHULTZ, *et al.* En el grupo 2 coloca la cepa de gallina L S/13, aislada en Inglaterra, y la de TEN BROECK (Estados Unidos de Norteamérica) y las cepas de JUNGHERR, JONES y LITTLE, BURN, GILL y CAREY. El grupo 3 es muy particular pues, está representado únicamente por la cepa de GIBSON. También investiga PATERSON la constitución antigénica de la cepa humana de WRIGHT y MACGREGOR (1939), encontrando que su estructura es diferente a la de las 27 cepas de listerelas por él estudiadas.

II. — MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Nosotros hemos estudiado el antígeno ciliar de cinco cepas de *Listerella monocytogenes*: una de conejo, denominada 58 XXIII, (MURRAY, *et al.*, 1926); dos humanas, aisladas una por PORZECANSKI y BAIGORRIA (1939), y otra por SAVINO (1940), cepas que hemos designado con los nombres «Montevideo» y «J. L.», respectivamente, una cuarta de origen ovino y una quinta de bovino, aisladas en Estados Unidos de Norteamérica (SEASTONE, 1935).

Preparación de suero aglutinante de conejo. — Con cada una de las cepas de *Listerella monocytogenes*, estudiadas en este trabajo, se preparó el correspondiente suero aglutinante.

Para la inmunización de los animales se utilizaron listerelas vivas, muy móviles, suspendidas en solución salina.

Con más pormenores diremos que: listerelas, pertenecientes a colonias lisas bien desarrolladas en agar Fildes — en las cuales se había previamente determinado sus propiedades culturales y sus reacciones bioquímicas — eran sembradas en frascos de agar Fildes y así incubadas a 20-22°C, durante 48 horas. Los desarrollos bacterianos obtenidos al cabo de este tiempo, se suspendían en solución salina y se llevaban a una concentración de 5.000 millones de bacterias por ml. (opacidad).

Los conejos se inoculaban una vez por semana. Las primeras inyecciones (0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 ml., de la predicha suspensión) se administraban por vía subcutánea. Después la inmunización proseguía por vía intravenosa (0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 ml., de esa misma suspensión). Cabe advertir, por otra parte, que cada vez se utilizaban suspensiones bacterianas confeccionadas con cultivos muy recientes.

Transcurridos 10 días después de la última inyección intravenosa (8ª de la inmunización total), los animales eran sangrados (punción cardíaca). La sangre, coagulada «in vitro», era centrifugada y el suero sobrenadante recogido en tubos de ensayo.

El suero aglutinante así obtenido, se conservaba en frío, sin agregado de sustancia conservadora alguna.

TÉCNICA PARA EL ESTUDIO DE LA CONSTITUCIÓN DEL ANTÍGENO CILIAR DE *Listerella monocytogenes*. — Se recurrió al conocido método de la absorción de aglutininas.

A 0,1 ml. de suero aglutinante (vide supra), se agregaban 10 ml. de una suspensión bacteriana con 100.000 millones de listerelas por ml. (opacidad), que habían desarrollado en agar Fildes (48 horas a 20-22°C). Los tubos con la mezcla suero-bacterias, eran primeramente colocados en baño de agua (50°C), durante 2 horas y, luego, transportado a la cámara fría, donde permanecían toda una noche. Al día siguiente, los tubos con suero-bacterias eran centrifugados. Una vez lograda la sedimentación de las bacterias, el líquido sobrenadante se recogía para realizar con él las pruebas de aglutinación.

Como testigo se empleó el mismo suero aglutinante sin absorber, al que se trató en la misma forma que al absorbido, con la única diferencia que, en lugar de la suspensión bacteriana, a 0,1 ml. de suero se añadió 10 ml. de solución de cloruro de sodio al 0,85 %.

La suspensión bacteriana para realizar la prueba de aglutinación se obtenía con la misma técnica descripta al hablar de la preparación del suero aglutinante. Esto es, siembras en agar Fildes, incubadas a 20-22°C durante 48 horas, cuyos desarrollos eran al cabo de este tiempo suspendidos en solución salina y llevados a una concentración de 5.000 millones de bacterias por ml.

El título aglutinante de los sueros absorbidos y sin absorber se determinaba colocando en una serie de tubos de ensayo, 0,5 ml. de diluciones decrecientes de suero y un igual volumen de la suspensión de bacterias (vida supra). Estas mezclas suero-bacterias permanecían una hora en baño de agua (50°C). Después se procedía a ver la aglutinación. El título aglutinante del suero estaba dado por la dilución límite de suero capaz de aglutinar a la suspensión de bacterias. En otras palabras, ese límite indica el número de dosis aglutinantes contenidas en un ml. de suero.

La Tabla N° 1 muestra los títulos aglutinantes de los sueros para las diferentes cepas de *Listerella*. De su examen deducimos que cualquiera de los sueros específicos preparados con cada una de las cepas estudiadas es capaz de aglutinar a todas estas cepas de listerelas en un título igual o algo menor que para la cepa homónima.

TABLA I
Títulos obtenidos en los ensayos de aglutinación

Suero aglutinante	Suspensiones bacterianas				
	Montevideo	J. L.	Conejo	Oveja	Bovino
Montevideo	6.400	6.400	6.400	3.200	3.200
J. L.	6.400	6.400	6.400	3.200	3.200
Conejo	3.200	3.200	3.200	1.600	1.600
Oveja	6.400	6.400	1.600	6.400	6.400
Bovino	3.200	1.600	1.600	3.200	3.200

TABLA II
Resultado de la absorción de aglutininas

Suero aglutinante	Suspensiones bacterianas de absorción	Suspensiones bacterianas de aglutinación				
		Montevideo	J. L.	Conejo	Oveja	Bovino
Montevideo	Montevideo .	0	0	0	0	0
»	J. L.	800	0	0	800	800
»	Conejo	800	0	0	800	800
»	Oveja	0	0	0	0	0
»	Bovino	0	0	0	0	0
J. L.	Montevideo .	0	3.200	3.200	0	0
»	J. L.	0	0	0	0	0
»	Conejo	0	0	0	0	0
»	Oveja	0	3.200	3.200	0	0
»	Bovino	0	1.600	3.200	0	0
Conejo	Montevideo .	0	1.600	1.600	0	0
»	J. L.	0	0	0	0	0
»	Conejo	0	0	0	0	0
»	Oveja	0	1.600	3.200	0	0
»	Bovino	0	1.600	1.600	0	0
Oveja	Montevideo .	0	0	0	0	0
»	J. L.	1.600	0	0	1.600	1.600
»	Conejo	1.600	0	0	1.600	1.600
»	Oveja	0	0	0	0	0
»	Bovino	0	0	0	0	0
Bovino	Montevideo .	0	0	0	0	0
»	J. L.	1.600	0	0	1.600	800
»	Conejo	1.600	0	0	1.600	1.600
»	Oveja	0	0	0	0	0
»	Bovino	0	0	0	0	0

Nota: El signo 0 indica que el título aglutinante es menor de 200.

En la Tabla 2 están contenidos los resultados de la absorción de aglutininas. De su análisis llegamos a la conclusión que las cepas « Montevideo » (de PORZECANSKY y BAIGORRIA), « Oveja », y « Bovino » responden a una misma constitución antigénica y por otra parte « J. L. » y « Conejo » (de MURRAY, *et al.*), tienen también igual comportamiento suerológico.

De nuestros experimentos deducimos que estas cinco cepas de *Listerella* las podemos dividir en dos grupos de acuerdo a la constitución del antígeno ciliar.

TABLA III

Agrupación de las cepas según constitución del antígeno ciliar

Grupo	Cepas	Constitución del antígeno ciliar
1	J. L. y Conejo	A.B.
2	Montevideo, Oveja y Bovino ..	B.C.

III. — RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la constitución del antígeno ciliar, de 5 cepas de *Listerella monocytogenes*, de distinto origen.

En estas cepas de *Listerella* hemos reconocido la presencia de tres fracciones antigénicas; lo cual permite reunir las en dos grupos diferentes. Cada grupo posee dos antígenos ciliares, uno es común a los dos grupos, el otro, en cambio, es característico de cada grupo.

El primer grupo comprende las cepas « J. L. » y « Conejo ». La primera fué aislada por nosotros en el hombre (un caso de meningoencefalitis) y la segunda por MURRAY, *et al.* en conejo. El segundo grupo incluye la cepa « Montevideo », aislada por PORZECANSKI y BAIGORRIA, también en un enfermo de meningoencefalitis, y las cepas de origen bovino y ovino (SEASTONE, 1935).

IV. — CONCLUSIONES

1. — Las observaciones sobre los caracteres antigénicos de los microorganismos del género *Listerella* unidas a los caracteres morfológicos, culturales y bioquímicos, nos induce a pensar que se trata de un género representado por una sola especie, *monocytogenes*, con caracteres bien definidos que permiten su identificación. Son bac-

terias patógenas del hombre y de los animales, que se caracterizan por su marcado neurotropismo y por la monocitosis que producen en la infección del conejo y en la angina monocítica del hombre.

2. — La cepa humana aislada por nosotros en un caso de meningoencefalitis tiene una estructura antigénica ciliar diferente a la cepa de PORZECANSKI y BAIGORRIA (también de origen humano) e igual a la de MURRAY, *et al.*, (conejo).

Al terminar debemos expresar nuestro agradecimiento al Dr. B. PORZECANSKI por las cepas de *Listerella* que nos envió y que nos facilitó la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. BURN, C. G. 1934. Unidentified Gram positive bacillus associated with meningoencephalitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 31: 1095-1097.
2. BURN, C. G. 1935. Characteristics of a new species of the genus *Listerella* obtained from human sources. *Journ. Bact.*, 30: 573-591.
3. BURN, C. G. 1936. Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*. *Amer. Journ. Pathol.*, 12: 341-348.
4. CAREY, B. W. JR. 1936. Infection with an organism of the genus *Listerella*. Report of case of acute cerebrospinal meningitis with recovery. *Journ. Pediat.* 8: 626-629.
5. GIBSON, H. J. 1935. A pathogenic diptheroid bacillus from a fatal case of meningitis. *Journ. Path. Bact.* 41: 239.
6. GILL, D. A. 1931. «Circling disease» of sheep in New Zealand. *Vet. Journ.* 87: 60-74.
7. GILL, D. A. 1933. Circling disease: a meningo-encephalitis of sheep in New Zealand. Notes on a new species of pathogenic organism. *Vet. Journ.* 89: 258-270.
8. GILL, D. A. 1937. Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Austral. Vet. Journ.* 13: 46.
9. JONES, F. S. y LITTLE, R. B. 1934. Sporadic encephalitis in cows. *Arch. Path.* 18: 580-581.
10. JULIANELLE, L. A. y PONS, C. A. 1939. Immunological and serological reactions of *Listerella monocytógenes*. *Proc. Soc. Biol. Med.* 40 (3), 364-365.
11. JUNGHEER, E. 1937. Ovine encephalomyelitis associated with *Listerella* infections. *Journ. Am. Vet. Med. Assoc.* 91: 73-87.
12. LEIFSON, E. 1930. A method of staining bacterial flagella and capsules together with a study of the origin of flagella. *Journ. Bact.* 30: 203-211.
13. MC GAUGHEY. (Citado por PATERSON, 1939).
14. MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A. y SWANN, M. B. R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *Journ. Path. Bact.* 29: 407-439.
15. NYFELD, A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 101: 590-592.

16. NYFELDT, A. 1932. Klinische und experimentelle untersuchungen über die mononucleosis infectiosa. *Folia Haemat.* 47 (1): 144.
17. PATERSON, J. S. 1937. *Listerella* infection in fowls. Preliminary note on its occurrence in East Anglia. *Vet. Rec.* 49: 1533-1534.
18. PATERSON, J. S. 1939. The present position regarding *Listerella monocytogenes* infection in animal and man. *Vet. Rec.* 51: 873-876.
19. PATERSON, J. S. 1939. Flagellar antigens of organisms of the genus *Listerella*. *Journ. Path. Bact.* 48 (1): 25-32.
20. PIRIE, J. H. H. 1927. A new disease of veld rodents « *Tiger River Disease* ». *Public. S. Afric. Inst. Med. Res.* 20 (3): 163-186.
21. PORZECANSKI, B. y BAYGORRIA, C. 1939. *Listerella monocytogenes*. A propósito de su constatación en el Uruguay en una meningoencefalitis humana. *Arch. Soc. Biol. Mont.* 9 (2) y 1940. *Arch. Clin. Inst. Endocrinología.* 1: 649-666.
22. SAVINO, E. 1940. *Listerella monocytogenes* aislada de una meningoencefalitis humana. *Semana Médica.* 47 (4): 227-229 y 1940. *Rev. Inst. Bact.* 9 (5): 587-592.
23. SAVINO E. 1940. Observación de listerelosis humana y acción terapéutica del « Dagenan ». *Semana Médica.* 47 (6): 336-339, y 1940. *Rev. Inst. Bact.* 9 (5): 593-601.
24. SCHULTZ, E. W., TERRY, M. C., BRICE, A. T., y GEBHARDT, L. P. 1933. Bacteriological observations on a case of meningo-encephalitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 31: 1021-1023.
25. SCHULTZ, E. W., TERRY, M. C., BRICE, A. T., y GEBHARDT, L. P. 1938. *Listerella monocytogenes*: a case of meningo-encephalitis in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38: 605-608.
26. SEASTONE, C. V. 1935. Pathogenic organism of the genus *Listerella*. *Journ. Exp. Med.* 62: 203-212.
27. TEN BROECK. (Citado por SEASTONE, 1935).
28. WATKINS, C. V. (Citado por PATERSON, 1939).
29. WEBB, R. A. y BARBER, M. 1937. *Listerella* in human meningitis. *Journ. Path. Bact.* 45 (3): 523-539.
30. WHITE, P. (Véase HICKS, E. P. 1930. *Journ. Hyg.* 29: 446-450).
31. WRIGHT, H. A., y MACGREGOR, A. R. 1939. A case of meningitis due to *Bacterium monocytogenes*. *Journ. Path. Bact.* 48: 470-472.