Constituyentes antigénicos de los Actinomyces y su empleo en las reacciones inmunológicas.

Por P. NEGRONI y RAQUEL FELDMAN

Este trabajo forma parte de una serie de investigaciones sobre la alergia e inmunidad en la actinomicosis experimental emprendida por la profesora R. Feldman, merced a la beca otorgada por la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. Hemos considerado necesario destacar este aspecto de los constituyentes antigénicos porque su aplicación en el diagnóstico de la actinomicosis promete ser de real beneficio.

Antecedentes: Ya en el año 1905, Rossi y Biagi, utilizaron la reacción de aglutinación como método auxiliar en el diagnóstico de la actinomicosis, pero sus resultados fueron poco satisfactorios.

Widal, en 1910, debido a la dificultad de obtener una suspensión homogénea del *Actinomyces* empleó, en colaboración con Abrami, Joltrain y Brissaud, la esporoaglutinación de grupo en la cual el antígeno consistía en una suspensión de esporos de un cultivo de *Rhinocladium* (*Sporotrichum*) *schenkii*. Estos investigadores, así como Yasbek (1920), obtuvieron con esta técnica reacciones positivas en casos de actinomicosis, pero la experiencia posterior demostró que esta reacción carece de valor diagnóstico.

Claypole (1913) utilizó en sus estudios experimentales extractos glicerizados análogos a los de la tuberculina vieja de Koch para efectuar las reacciones de fijación del complemento y las cuti e intradermorreacciones.

Yasbek (1920) y Bailly, A. (1921), obtuvieron resultados positivos en las reacciones de fijación del complemento con sueros de sujetos enfermos de actinomicosis. Resultados similares fueron obtenidos por Henrici y Gardner (1921) empleando un antígeno consistente en una mezcla del caldo en el cual había desarrollado una cepa de *Actinomyces asteroides* aislada de un caso humano de pseudo-tuberculosis pulmonar y de sus cuerpos micelianos. La reacción de aglutinación dió también resultados positivos, pero en la dilución

de 1/20 del suero de los pacientes, finalmente, la inyección intradérmica de este antígeno no provocó reacción local alguna, pero produjo en cambio escalofrío y fiebre que desapareció al día siguiente. Estos resultados fueron específicos puesto que las mismas reacciones efectuadas en sujetos testigos (sin actinomicosis) dieron resultados negativos.

Según Lieske (1921) la reacción de aglutinación tropieza con la dificultad de obtener una suspensión homogénea del micelio de los *Actinomyces*, lo cual se logra únicamente con los esporos de ciertas cepas aerobias. La reacción de precipitinas sería para ese autor poco utilizable en la práctica debido a que sus resultados son frecuentemente negativos. Sostiene en cambio que la reacción de fijación del complemento es la que proporciona resultados más satisfactorios.

Walker, J. (1923), aconseja efectuar en todo enfermo sospechoso de padecer de actinomicosis, las tres pruebas siguientes: fijación del complemento, reacción de Wassermann e intradermorreacción con antígeno específico. En cinco casos de actinomicosis en actividad y, efectuando la misma reacción con diez sueros de sujetos sífilíticos, obtuvo un resultado positivo y cuatro dudosos. Mediante la inyección intradérmica del antígeno en siete enfermos de actinomicosis observó en seis una reacción local del tipo tuberculínico y elevación de temperatura al segundo día (reacción general). La misma reacción efectuada en 37 personas sanas dió un resultado positivo (2,7 %).

Dessy, G. (1926) utilizó, sin éxito, en sus estudios experimentales las reacciones de aglutinación, precipitación y termoprecipitación. Para las reacciones de fijación del complemento empleó un antígeno similar al de Boquet y Nègre consistente en un extracto metílico de los cultivos de *Actinomyces*, utilizado también más tarde por Goyal, R. K. (1938).

Arêa Leão demostró que la inyección intradérmica del producto obtenido por la filtración por bujía de un cultivo de *Act. bovis* en caldo, de un año y medio de incubación, produce una reacción positiva en los enfermos de actinomicosis.

Neuber, E. (1940), obtuvo 60 a 70 % de especificidad en las reacciones de fijación del complemento utilizando como antígeno un extracto acuoso de los cultivos de *Actinomyces*. Este investigador recomienda efectuar la intradermorreacción con antígeno homólogo. Finalmente mencionaremos los trabajos de Drake y Henrici (1943), quienes obtuvieron los mejores resultados para revelar la alergia cutánea inyectando a los animales de laboratorio infectados experimentalmente, la fracción proteica del *Act. asteroides*.

NUESTRAS EXPERIENCIAS

Los antígenos utilizados fueron preparados con dos cepas (n° 73 y 74) de *Actinomyces asteroides* aisladas de casos de micetomas en Buenos Aires, siguiendo en líneas generales las técnicas descritas por Drake y Henrici:

1. *Asteroidina*: preparada en forma similar a la tuberculina vieja de Koch (OT).

2. *Filtrado*: Cultivo en el medio de Sauton de un mes de incubación a 28°C, filtrado por Seitz esterilizante EK y adicionado de 1/10.000 de mertiolato de sodio.

3. *Extracto crudo*: La película desarrollada en el medio de Sauton, se la lava con agua destilada (en un filtro Buchner), se la extrae con acetona, se la deseca y pulveriza. Extraer 2 g. de la película pulverizada con 100 ml. de agua destilada durante 24 h. en la cámara fría, filtrar por Seitz y adicionar de 1/10.000 de mertiolato de sodio.

4. *Proteína*: preparada según la técnica de Drake y Henrici. El antígeno se preparó disolviendo 5 mg. del producto liofilizado en 10 ml. de solución fisiológica.

5. *Polisacárido*: se preparó el antígeno disolviendo 20 mg. del producto liofilizado en 10 ml. de solución fisiológica. Para conservar las soluciones hemos adicionado siempre 1/10.000 de mertiolato de sodio.

6. *Extracto ácido*: la película del *Actinomyces* se extrae con acetona, se la deseca y pulveriza suspendiendo 100 mg. del polvo en 2,5 ml. de solución fisiológica. Llevar a pH 3,0 con HCl, se calienta en baño de María hirviendo agitando periódicamente durante quince minutos. Enfriar, llevar a pH. 7,2 con OHNa. Centrifugar y adicionar al líquido claro sobrenadante 1/10.000 de mertiolato de sodio.

Este antígeno se preparó, pues, según la técnica de Brown, utilizada en la clasificación serológica de los estreptococos (Schaub y Foley, 1943).

7. *Lípidos*: 2 ml. del extracto acetónico se evaporan en caja de Petri a 37°C y el residuo se emulsiona en 4 ml. de agua destilada adicionándola gota a gota y frotando con un tapón de goma. Esta emulsión madre se la diluyó convenientemente para las pruebas serológicas.

RESULTADOS

Con los antígenos anteriormente descritos se efectuaron las siguientes pruebas serológicas y de alergia cutánea: a) fijación del complemento; b) precipitinas; c) intradermorreacción.

Fijación del complemento: Esta reacción serológica efectuada en seis sujetos que padecían de actinomicosis (cérvicofacial cinco casos y metastásica un caso) y en cuatro sujetos indemnes de actinomicosis (dos sueros con reacción de Wassermann positiva y dos negativa), dió invariablemente resultado negativo con los antígenos 4, 6 y 7.

Precipitinas: Se emplearon en estas reacciones todos los antígenos descritos salvo los lípidos (nº 7). Con los siguientes resultados: los sueros de ocho conejos inoculados experimentalmente con las cepas de *Actinomyces* ya mencionadas, cuatro dieron precipitinas positivas únicamente con el antígeno 6 (extracto ácido). Estas reacciones se efectuaron con la técnica de gotas en cajas de Petri efectuando las lecturas al cabo de treinta minutos con el objetivo seco débil (16 mm.), es decir, bajo control microscópico.

Todos los sueros humanos de los seis enfermos ya mencionados reaccionaron con el antígeno nº 6 únicamente y dos débilmente también con el nº 5. De esta serie de experiencias debemos eliminar el suero del paciente con actinomicosis metastásica que tenía la propiedad de flocular con la solución fisiológica.

Sobre ocho sueros de sujetos indemnes de actinomicosis tomados como testigos (cuatro Wassermann positiva y cuatro con reacción de Wassermann negativa), cuatro dieron precipitinas positivas con el antígeno nº 6 y otros de los empleados en estas reacciones, pero flocularon además con solución fisiológica.

Intradermorreacciones: Utilizamos en estas pruebas únicamente el extracto ácido y la fracción proteica (antígenos nº 4 y 6) con los siguientes resultados:

En cinco enfermos de actinomicosis cérvicofacial la intradermorreacción con el extracto ácido fué positiva y negativa en cambio con la fracción proteica. Las lecturas se efectuaron a las 24 horas y las reacciones eran del tipo tuberculínico. El enfermo con actinomicosis metastásica reaccionó con ambos antígenos pero más intensamente con el extracto ácido.

Testigos: efectuamos las mismas reacciones en siete enfermos internados por diversas afecciones dermatológicas en la Sala XIV del Hospital Ramos Mejía, pero indemnes de actinomicosis con los resultados siguientes: en cuatro de ellos ambas reacciones fueron negativas y en tres positivas, cuyo detalle exponemos a continuación:

C. W., cama 29, 40 años de edad: reacción con extracto ácido ++, con proteína +. El examen bucal revela un pésimo estado dentario con caries avanzadas.

U. E. B., cama 46, 20 años de edad: reacción con extracto ácido: ++, con proteína +. El examen bucal revela la existencia de un granuloma en la arcada dentaria a nivel de la muela del juicio inferior izquierda.

N. N., cama 43, 19 años de edad: reacción con extracto ácido: +, con proteína +. El examen bucal revela la existencia de dos caries avanzadas y de un mal estado amigadalino (criptas).

RESUMEN

Las pruebas serológicas y cutáneas no han sido hasta el presente un auxilio útil en el diagnóstico de la actinomicosis.

Nuestra experiencia indica que las fracciones lípidas, proteica e hidrocbonada del *Act. asteroides* preparadas con las técnicas habituales dan reacciones serológicas negativas con los sueros de sujetos enfermos de actinomicosis y con los de conejos infectados experimentalmente. El mismo resultado negativo hemos obtenido mediante la inyección intradérmica de la fracción proteica a los enfermos de actinomicosis.

El empleo de un extracto ácido similar al utilizado en la clasificación serológica de los estreptococos nos ha proporcionado, en cambio, resultados promisoros. Se obtienen con éste reacciones de precipitinas positivas con los sueros mencionados y la intradermo-reacción en los enfermos de actinomicosis es también positiva. Los sujetos indemnes de actinomicosis que reaccionaron a la inoculación intradérmica de este antígeno reaccionaron también con la fracción proteica (hecho no observado en los enfermos) y su examen reveló además la existencia de focos sépticos bucales o faríngeos.

BIBLIOGRAFÍA

- YASBEK, A. K.: *Dos mycetomas*. These inaugural. Medicina. Sao Paulo, 1920.
- LIESKE, R.: *Morphologie und Biologie der Strahlenpilze*. Leipzig. Gebrüder Borntraeger, 1921.
- CIANI, G.: *Actinomicosi e Streptotricosi*. L. Cappelli, Ed., Bologna, 1923.
- SANTORY, A. et BAILLY, A.: *Les mycoses pulmonaires et leur parasites*. Ed. Clinique et Laboratoire. Rome-Paris, 1923.
- WALKER, J.: *Mitt. Grenzgebiete d. Med. u. Chir.*, 1923, 36, 55.
- PERIN, A.: *Le micosi polmonari*. Siena. Libreria Ed. Senese, 1925.
- DESSY, G.: *Boll. Ist. Sieroter.* Milanese, 1926, 5, 399.
- FREUND, J.: *J. Immunol.*, 1927, 13, 161.
- NEUBER, E.: *Wiener Klin. Woch.*, 1932, 45, 357, y 1938, (2), 48.
- GOYAL, R. K.: *Indian J. Med. Res.*, 1938, 25, 843.
- FONSECA, O.: *Parasitología Médica*. Editora Guanabara, Río, 1943.
- DRAKE, C. H. and HENRICI, A. T.: *Amer. Rev. Tuberculosis*, 1943, 48, 184.
- LACAZ, C.: Contribuição para o estudo dos Actinomicetos productores de micetomas. São Paulo, 1945.
- REDAELLI, P. e CIFERRI, R.: *Le granulomatosi fungine dell'uomo nelle regioni tropicali e subtropicali*. S. E. S. Firenze, 1942.
- SCHAUB, I. G. and FOLEY, M. K.: *Methods for diagnostic bacteriology*. St. Louis. The C. V. Mosby Co., 1943.