

## ANTIGENO VI y CEPA BALLERUP

Por NESTOR MORALES VILLAZON y DORA E. GIOVANNETTI

Estudiando la estructura de las bacterias, Smith y Reagh demostraron que la del Hog cólera tenía dos diferentes antígenos; según se tratara de la forma móvil o inmóvil. Con la primera la aglutinación con suero homólogo, forma grumos gruesos, fácilmente dissociables, es poco específico y termolábil; mientras con la segunda, es de tipo granuloso, no dissociable, termoestable y de gran especificidad. En 1.904 estas observaciones fueron completadas por Beyer y Reagh, que comprobaron que el primero o ciliar ocupa la superficie, siendo fácilmente alterable por el calentamiento por quince minutos a 70°, mientras que el segundo o somático, soporta sin alterarse larga ebullición, y está en el interior del protoplasma.

En época posterior Weil y Félix (1917) en una importante serie de estudios, fijaron mejor los atributos de ambos antígenos y les designaron con las letras H (ciliar) y O (somático). Estas investigaciones fundamentales sobre las propiedades biológicas del protoplasma bacteriano, han recibido últimamente la contribución de: Zinzer, Parker, Avery, Lancefield, Heidelberg, Gobel, Griffith, Reiman, White y muchos otros; entre las que merece cita aparte las de Andrew, que fué el primero en señalar las interesantes variaciones de fase del antígeno ciliar.

Durante largos años en las salmonellas y en especial en la tífosa, se consideró definitivamente fijada la constitución antigénica, que en concepto de los investigadores respondía a la estructura H y O y podía servir, como efectivamente lo ha sido, para los usos clínicos. Conocemos bien los importantes servicios prestados a la humanidad por la aglutinación de Widal, gracias a la que se han podido localizar rápidamente focos de tifus abdominal, que de otra suerte habrían quedado por largo tiempo desconocidos. Con este antecedente, es fácil comprender el interés despertado por Félix y Pitt, cuando en 1934 anunciaron el descubrimiento de un nuevo factor en las cepas de Eberth. Estos autores en las formas lisas, (S) dijeron haber encontra-

do uno distinto de los antes conocidos y que era débilmente influido por el antisuero O y cuya sensibilidad es inversa a la de la virulencia. Colonias apenas aglutinadas por el suero O matan el 10 por 10 de las lauchas inoculadas con un millón de gérmenes, mientras que las fuertemente aglutinadas por dicho antisuero, no matan, ni uno solo de los animales inoculados. Pero como este nuevo factor no está solo, sino que en proporción variable se le encuentra mezclado con las aglutininas H y O, para obtener un suero anti V<sub>i</sub> rigurosamente específico, hay que absorber previamente las aglutininas H y O, lo que es motivo no sólo de largas manipulaciones, sino que el menor descuido puede motivar el fracaso, por infección exógena. Por fortuna el hallazgo de una salmonella que posee antígeno V<sub>i</sub> exclusivo, ha venido a simplificar el problema. El 18 de noviembre de 1939 Kauffman y Erba Moller, lograron aislar de las deyecciones de cierta enferma, un germen, que teniendo todos los caracteres de las salmonellas, no era aglutinado por el antisuero de ninguna. La enferma de 69 años de edad, procedía de Ballerup, ciudad de la que ha tomado el nombre. Desde el mes de octubre del mismo año, sufría de desórdenes gastro-intestinales, con vómitos, diarreas y temperatura alta. Después de varias semanas, durante las que se asistió en su domicilio y en vista de que lejos de mejorar su estado empeoraba, se internó en el Copenhagen Couty Hospital. La reacción de Widal para Eberth, para A y B, repetida en varias oportunidades, dió resultado negativo. Por coprocultivo se aisló un germen, que serológicamente no correspondía a ninguna de las otras salmonellas conocidas y sólo reaccionaba con antígeno V

### CARACTERES DE LOS CULTIVOS

Gram negativo, desarrolla bien en caldo y agar, en este último medio las colonias son: lisas, translúcidas, ligeramente prominentes, de bordes regulares: licúa gelatina, fermenta arabinosa, dextrina, glucosa, dulcita, maltosa, manita, rhamnosa, sorbitol, trealosa, xilosa; tardíamente salicina, no fermenta adonita, inositol, lactosa y sacarosa. Reacción positiva en Bitter Weigman Habs: negativa en Sternén. Fermenta d- tartrato después de siete días y citrato de soda a los dos. Produce hidrógeno sulfurado. La reacción del indol es negativa.

En los cultivos en placas, los autores arriba citados, dicen haber comprobado dos clases de colonias: unas opacas y otras translúcidas, las que podrían fácilmente distinguirse aún a simple vista. Las opacas se revelan constantes y sólo rara vez se les vió disociarse en la forma translúcida: mientras éstas son poco estables. La forma opaca con-

tiene el antígeno V<sub>i</sub>, que no existe en las otras. Este hecho es comparable con lo que ocurre con la *Salmonella tify*, en la que los investigadores han señalado fenómeno igual, que se puede sintetizar en el adjunto cuadro.

		Aspecto de las colonias		O	V <sub>i</sub>
S. <i>tify</i> forma V		Opaca	No aglutina		Aglutina
S. " " W		Translúcida	Aglutina		No aglutina

Por lo que a nosotros se refiere, en las repetidas veces que hemos hecho cultivos en placas de la cepa Ballerup, no nos ha sido posible comprobar la diferencia en el aspecto de las colonias, que nos dieron la impresión de ser uniformemente translúcidas. La explicación del desacuerdo, posiblemente se deba a que la cepa remitida al Instituto, provenía de una colonia de este tipo, que por una razón cualquiera ha permanecido inalterada a través del tiempo y de los innumerables pasajes hechos para conservarla; sin embargo esta explicación, no está de acuerdo con su valor en antígeno V<sub>i</sub>, que según Kauffman y Erba Moller, no existe en este tipo de colonias.

Respecto a las cilias de la cepa Ballerup, de la que nada dicen Kauffman y Erba Moller, son peritricas y en número que oscila de cinco a siete.

Para su tinción empleamos la técnica de Lifson modificada, de la que ya nos ocupamos en un trabajo anterior (1) y en la que adoptamos una ligera variante, que consiste en reemplazar el alumbre de potasio por el sulfato de aluminio y potasio, que en varios ensayos, nos dió mejor resultado que el anterior.

Ya en otro punto hemos manifestado, que nos fué imposible confirmar lo sostenido por los investigadores tantas veces mencionados, respecto al valor de las colonias opacas y translúcidas en antígeno V<sub>i</sub>, pues no pudimos encontrar diferencia apreciable y ambas nos parecieron exactamente iguales.

Posteriormente nos enteramos del trabajo de Nicoll, Jude y Le Minor, publicado en los Annales del Instituto Pasteur de París del año 1950, con el título de: "Relation entre l'intensité de la irisation présentée par certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique". Inmediatamente resolvimos repetir las experiencias de los sabios franceses, sirviéndonos de sujeto la cepa Ballerup conservada en la colección.

(1) Néstor Morales Villazón y Yolanda Righetti. — Infección accidental de los medios al cultivo.

Empezamos por hacer aislamientos sucesivos en placas de Petri, de las colonias en las que era posible apreciar cambios luminosos frente a un foco de luz provisto de vidrio opaco. Después de cuatro a cinco ensayos, pudimos notar que habían colonias que colocadas frente al foco luminoso y moviendo la placa, de suerte que los rayos cayeran en distintos ángulos de incidencia, presentaban una hermosa iridiscencia, que recorría toda la gama del espectro, si bien con el hábito, era posible comprobar que en cada una habían colores dominantes: escogimos el azul, el verde, y el rosa, color este último que en algunos casos era tan intenso, que las colonias asemejan pequeños rubíes.

Los reflejos de luz son realmente interesantes y justifican que Nicoll y colaboradores, los hayan comparado con el ala de ciertas mariposas tropicales, que parecen despedir destellos fulgurantes, cuando las hieren los rayos del sol.

Al mismo tiempo, que estas experiencias, quisimos también estudiar las colonias de la cepa *Salmonella tífica* T y 2, que es la que hoy se utiliza en la Sección para preparar la vacuna.

Siguiendo la técnica anterior, se procedió a aislar las colonias iridiscentes y entre estas elegimos las que como en el caso mencionado por Nicoll, ofrecían una intensa irización amarilla y otras en las que faltaba reacción luminosa. Las pruebas de aglutinación, con suero anti Vi sobre placas, siguiendo la técnica de Huddleson, demostraron que las primeras eran fuertemente aglutinadas, mientras que las últimas no reaccionaban ni ante concentraciones del suero de uno en veinte. Estas experiencias, de indiscutible valor probatorio, demuestran que el contenido en antígeno Vi, no hay que buscarle en la distinta opacidad de las colonias, sino en la intensidad de la irización. Confirmando lo dicho, en el boletín del World Health Organization, correspondiente al mes de Noviembre de 1950, se aconseja para la preparación de los sueros aglutinantes anti Vi, utilizar colonias iridiscentes, lo que significa que ese alto tribunal científico, comparte la opinión de Nicoll.

#### PREPARACION DEL SUERO AGLUTINANTE ANTI VI

De las colonias iridiscentes Ballerup se eligieron tres, en las que predominaban los colores: azul, verde y rosa. La técnica seguida fué la que aconseja el World Health Organization.

Cultivos de 24 horas en agar ordinario, de los tipos escogidos mezclados por partes iguales, se recogieron en suero fisiológico formulado al 0.50 %. La suspensión se dejó en la heladera por 48 horas.

Control de esterilidad. Si el resultado es positivo, se titula por opacimetría a 2.000 millones de gérmenes por  $\text{cm}^3$ . Las inoculaciones se hacen por vía endovenosa, en conejos de dos a tres kilos de peso, con intervalos de cuatro días y en la siguiente escala: 1.000 — 2.000 — 3.000 y 4.000 millones por centímetro cúbico. Luego de la última inoculación y pasado 8 días, se hace sangría de prueba y si el título es satisfactorio, se sangran los animales al blanco por punción de la carótida. Si son varios los conejos que se inmunizan, para tener título uniforme, hay que mezclar los sueros. La sangre se pone por dos horas en la estufa y por 24 a 48 horas en la heladera, se recoge el suero y se centrifuga. Para la titulación definitiva se hacen diluciones del suero en escala ascendente: 1: 25 — 50 — 100 — 200 — 400 — y 800, a estas diluciones se añade una cantidad igual de la suspensión de la cepa homóloga titulada a 5.000 millones de gérmenes por  $\text{cm}^3$ . Dos horas en la estufa y una noche en la heladera o a la temperatura del laboratorio. Por regla general la lectura que se hace a las dos horas, no cambia posteriormente.

Con el suero obtenido, se hicieron tres pruebas; la primera consistió en titularle con la cepa homóloga, dió 1: 800 —; la segunda en poner en contacto diluciones crecientes del suero anti V<sub>1</sub>, con las tres cepas iridiscentes que sirvieron para su preparación: El objeto era saber si el color dominante tenía o no influencia sobre su sensibilidad y el resultado fué el que sigue.

Dilución del suero Bellarup	1 por 50	1 por 100	1 por 200	1 por 400	Control
Iridiscente azul .....	++++	+++	+++	+	0
Iridiscente verde .....	+++	++	+	+	0
Iridiscente rosa .....	++++	+++	+++	++	0

La lectura, después de dos horas en la estufa a 37° y una noche en la heladera. Como vemos el título varía poco, siendo el verde el de menos valor, mientras que el rosa da cifras más altas.

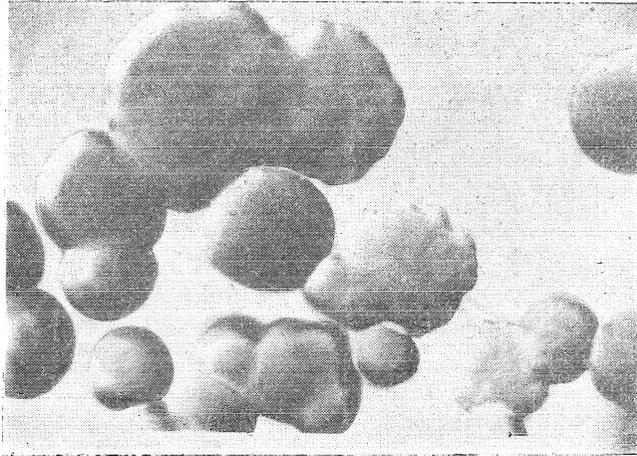
La segunda experiencia se realizó sobre varias cepas de Eberth, de colección y la T y 2 que como ya dijimos, es la que se utiliza para la vacuna antitífica. Con estas cepas se procedió como sigue: por aislamiento previo en placas, se procuró conseguir colonias fuertemente iridiscentes y entre ellas las de intenso color amarillo y otras opacas; sobre ambas se hizo actuar el suero y también sobre el cultivo total. La lectura se hizo en iguales condiciones que en el caso anterior y están condensados en el cuadro adjunto:

Suero Bellarup	Diluciónal:				
	1 por 50	1 por 100	1 por 200	1 por 400	Control
Eberth L V 4 .....	0	0	0	0	0
« Watson .....	+++	+++	++	+	0
« 3112 .....	0	0	0	0	0
« 5076 .....	+++	+++	++	+	0
« 0901 .....	+++	+++	++	+	0
« T y 2 total .....	+++	+++	++	0	0
« T y 2 iridisente ...	++++	+++	+++	+	0
« T y 2 opacas .....	0	0	0	0	0
Ballarup rosa .....	++++	+++	++	++	0

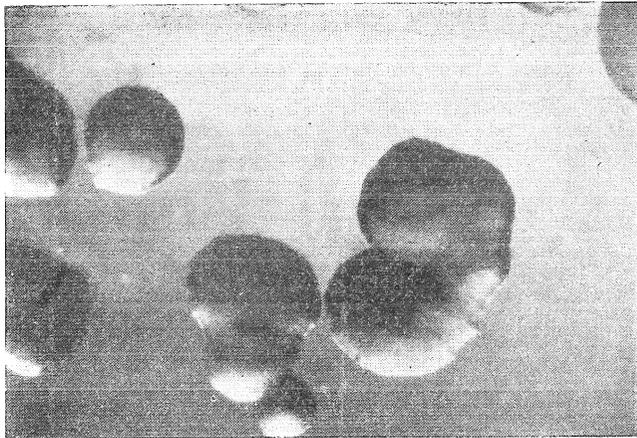
Examinando el cuadro que antecede, es fácil comprobar que tres de las cepas de las guardadas hace varios años en la colección, han conservado casi íntegramente el contenido en antígeno Vi y esto no obstante que los trasplantes siempre se hacen en agar simple y quedan a la temperatura del laboratorio, lo que está en desacuerdo con las afirmaciones del sabio italiano Dr. Carlinfanti, que sostiene que con el fin de que no pierdan el antígeno Vi, se las debe tener constantemente en la estufa a 57°. Otras dos carecen en absoluto de este antígeno. De suerte que no es aventurado opinar, que la virtud de conservar íntegro el contenido Vi, es función propia de la cepa, y no de la temperatura.

Conclusiones: Nos ha sido imposible comprobar el valor de las cepas opacas y claras de Kauffmann, en la cepa Ballarup.

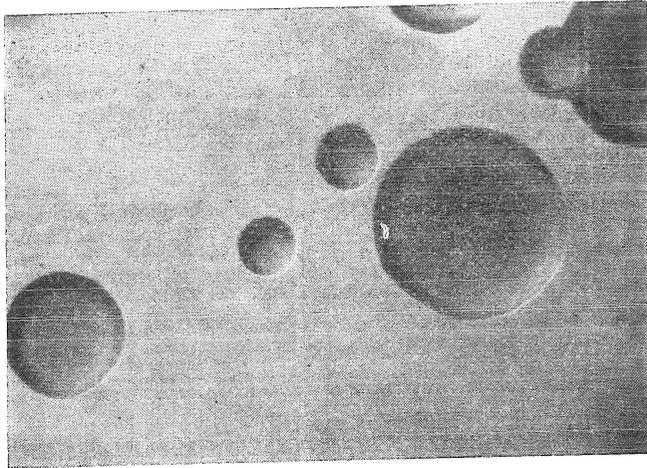
1. — El mayor contenido en antígeno Vi de las colonias iridiscentes es indudable.
2. — De las cepas de colección, unas han perdido todo el antígeno Vi, mientras otras le han conservado casi al mismo título que las iridiscentes.
3. — El resultado de la aglutinación con la cepa iridisente rosa, confirma en todas sus partes, la opinión sostenida por Nicoll, de que la riqueza en antígeno Vi, hay que buscarle en la curiosa reacción de las colonias a la luz, siendo la prueba que las que no lo hacen, se muestran poco sensibles a la acción aglutinante del suero.



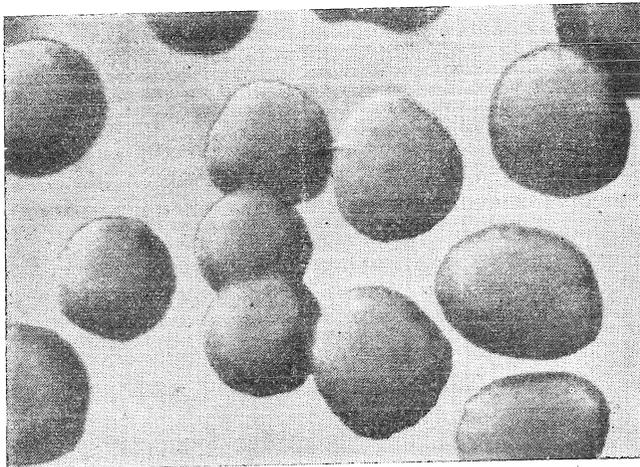
*Ballerup original Colonias S y R*



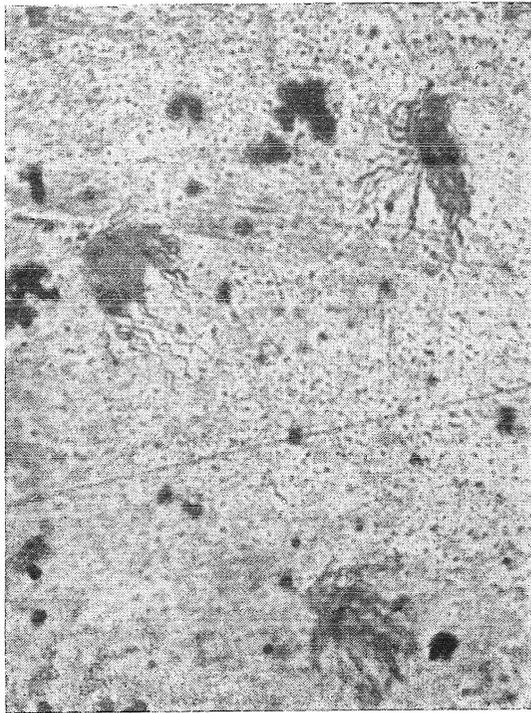
*Ballerup amarilla*



*Ballerup* irización verde, bordes ligeramente irregulares



*Ballerup rosa*, Superficie brillante lisa



Cibus de la cepa *Ballerup*