

CONSERVACION DE LA VARIANTE P DEL ANTIGENO VÍ

Por NESTOR MORALES VILLAZON y DORA E. GIOVANNETTI

Es hecho conocido y sobre el que anteriormente hemos llamado la atención, que las cepas aisladas de enfermos de tifus abdominal, contienen en mayor o menor cantidad antígeno VÍ, pero mientras la gran mayoría le pierden en breve plazo, otras le conservan en forma indefinida, si bien con tendencia a la merma sobre el nivel primitivo.

Las investigaciones llevadas a cabo en diversos institutos han demostrado que este antígeno no es único, sino que ofrece una serie de variantes, puestas de manifiesto por Kauffmann, A. Kando y Nakamura. El primero, ha logrado diferenciar hasta doce, que es lo que se conoce con el nombre de esquema de Kauffmann.

Carlinfanti, cuya importante contribución a este interesante capítulo de la inmunología es universalmente apreciado, divide las variantes en cuatro tipos, en la forma que sigue.:

Variantes	Proporción en antígeno VÍ	Aglutinabilidad		
		VÍ	O	H
P	+++	+	—	—
V	++	++	—	+
V W	+	+	+	+
W	+	+	++	++

Fácil es darse cuenta examinando el cuadro que antecede, que la variante P. (patológica) de Carlinfanti, es la que posee mayor proporción de antígeno VÍ y si el título de aglutinabilidad, es relativamente bajo, se debe a que le es propio ser hipoaglutinable.

Hace cinco años poco más o menos, que interesándonos en el estudio del nuevo factor serológico descubierto por Félix, nos propu-

simos repetir algunas de las experiencias realizadas por los investigadores extranjeros y con esta mira, solicitamos del Instituto Serológico de Nápoles, una cepa que fuera ricamente dotada de este factor. Poco tiempo después, recibimos por gentileza de su Director el Dr. E. Carlinfanti, un cultivo en agar de la cepa T y 2 de *Salmonella typhi*, que es la misma que fué objeto de múltiples trabajos por parte de Félix y Pitt.

El primer subcultivo, se inoculó por vía intraperitoneal a un lote de 10 lauchas de 16 gramos de peso y en la proporción de 1.000 millones de gérmenes por cm³. El resultado fué decepcionante, pues ni uno solo de los animales murió, lo que significaba que sea por el largo viaje o por otra causa cualquiera, había perdido casi por completa la virulencia.

El segundo experimento se hizo en condiciones parecidas, pero con el título de 5.000 millones por animal inoculado. Al día siguiente se encontraron muertas el ochenta por %. Se tomó sangre por punción cardíaca y previa las pruebas habituales para garantizar la pureza del germen, se hicieron nuevos ensayos, disminuyendo en cada vez el número de gérmenes infectantes. A partir de este momento, y por reinoculaciones sucesivas, se fué exaltando la virulencia.

Cuando teníamos la impresión de que las cosas marcharían sin mayor tropiezo, una infección accidental, nos obligó a ser más cautos y depurar la técnica.

Marcha de la experiencia y métodos

Consistió dicho contratiempo en que en uno de los últimos aislamientos, el material resultó infectado por bacilo coli, que posiblemente por migración desde el intestino pasó al sistema circulatorio. Para ponernos a cubierto de cualquier nueva sorpresa, en lo sucesivo adoptamos la siguiente precaución: la sangre, en lugar de sembrarla en placas de agar simple, se hace en agar lactosa - bromocresol púrpura y sólo se utiliza el material en el que no se encuentra ninguna colonia extraña, de esta manera hay la certeza, de que los cultivos son puros.

Las siembras se emulsionan en pequeña cantidad de fisiológica y debidamente tituladas, se inoculan por vía intraperitoneal a lotes de 10 lauchas por vez. El aumento de virulencia se hizo en forma sostenida y llegamos a un límite, que no sabemos haya sido alcanzado por otros laboratorios; con 25 millones de gérmenes se provocó el 70 al 80 % de muertes en 24 horas.

Desgraciadamente nunca se pudo conservar tan elevado título y cuantos esfuerzos se efectuaron en este sentido, terminaron en el fra-

caso. Pensando que si se pretende tener vacunas dotadas de un alto poder inmunizante, es necesario contar con cepas que mantengan en forma estable el contenido en antígeno Vi, se realizaron varios ensayos, de los cuales y en forma sintética, por su limitada importancia, sólo daremos cuenta de los más representativos.

Siembras en agar sangre de conejos al 5 %. Recordando que los investigadores ingleses en la India, conservaban la virulencia de la *pasteurella pestis* mediante la siembra del material infeccioso en agar sangre de conejo al 5 % y teniendo como antecedente, nuestra propia experiencia, que por este procedimiento logramos que por más de tres años la cepa Kimberley, no perdiera nada de su primitiva actividad, hicimos siembras de la sangre del corazón en dicho medio, los cultivos quedaron unos en la estufa a 37° y otros en la heladera.

Luego de dos meses se hizo la prueba de virulencia, que demostró que había disminuído considerablemente.

Cultivos por punción en agar semisólido; bajo capa de vaselina líquida

Es un fenómeno conocido en bacteriología, que el oxígeno obra sobre los seres microbianos, sea exaltando su poder patógeno y la producción de toxinas o el fenómeno contrario, es decir que el oxígeno atmosférico actúa convirtiendo en avirulentos, gérmenes primitivamente temibles, los ejemplos mejores conocidos son el del bacilo de Klebs Loeffler y la depuración del suelo y las aguas por la luz solar y el oxígeno. Con esta orientación, se sembró tanto la sangre directamente tomada del corazón, como los cultivos en placas, en la superficie de tubos con agar semisólido. Estufa a 37° por 24 horas. El resultado fué malo y los cultivos apenas perceptibles, o en absoluto negativos. Este hecho nos obligó a modificar el método, para lo que procedimos como sigue: los cultivos antes de cubrirlos con la vaselina líquida, se los dejó por 24 horas en la estufa a 37°. El desarrollo fué abundante, pero los subcultivos efectuados un mes después, demostraron que los gérmenes habían muerto o bien solo quedaban escasas colonias de resistencia, desprovistas de todo valor.

Sangre conservada al vacío. En varios ensayos que desde hace tiempo efectuó uno de nosotros en la sección Peste (Dr. Morales) se pudo comprobar que la sangre de los animales infectados con el bacilo de Yersin, se conserva virulenta por este medio al través de varios años, cosa igual pasa con los diferentes tipos de neumococcus, que durante mucho tiempo no pierden la virulencia primitiva. Era pues

lógico suponer, que el mismo fenómeno se repetiría con el bacilo de Eberth; desgraciadamente nuestras previsiones no se cumplieron.

Cultivos conservados al vacío. El resultado fué en todo comparable al anterior. En estas circunstancias conocimos el importante estudio de Nicoll y colaboradores sobre las colonias iridiscentes y de inmediato quisimos repetirlo.

Una emulsión muy diluída de la cepa T y 2 se sembró en placas de Petri. A las 24 horas con la ayuda de un foco de luz, cuya incidencia sobre las colonias se hace variar, se eligieron las que presentaban un mayor grado de iridiscencia y tinte amarillo. Obtenido el cultivo puro, se inocularon treinta lauchas por lotes de 10 con 25—50— y 100 millones; a las 24 horas todos los animales habían muerto. Este resultado, en todo de acuerdo con las conclusiones de los sabios del Instituto Pasteur, demostró que el factor V_i, en su variante P, hay que buscarle en la iridiscencia de las colonias.

Se procedió a una nueva siembra de la sangre, tomada por punción del corazón, eligiendo siempre las de acentuada iridiscencia y se sembraron colonias aisladas en tubos de agar, y agar sangre al 5 % que se guardaron; una mitad en la estufa y otra en la heladera. Con estas últimas, cuya fecha de conservación data del mes de junio del año próximo pasado, se repitieron las experiencias anteriores inyectando, por vía intraperitoneal, lauchas, con 25 millones de gérmenes por cm³. Con satisfacción comprobamos, que nada había perdido de la virulencia primitiva. Con el fin de estar seguros, multiplicamos las inoculaciones, con lotes de cuarenta lauchas y uniformemente se pudo comprobar que el 100 por 100 de los animales morirían dentro de las veinticuatro horas.

Sin pretender explicar un fenómeno que requiere estudios de mayor amplitud, adelantamos la presunción de que, por causas ignoradas en los cultivos artificiales, aumenta rápidamente la cantidad de colonias no iridiscentes, de suerte que es probable que al cabo de cierto tiempo, éstas constituyen la mayoría, ya que las emulsiones con el título de 50 ó 100 millones, en realidad tienen contados gérmenes infectantes, lo que motiva que mueran pocos o no muera ninguno de los animales. Es indudable que en el terreno de la ciencia experimental, las presunciones nada valen y es necesario comprobar lo que se observa, pero como esta labor es de largo aliento, hemos creído interesante hacer conocer lo hasta hoy documentado.

¿Cuál sería la explicación de que los cultivos en la heladera guarden la variante P del antígeno V_i? En nuestra opinión se debe-

ría a que, a baja temperatura no se produce cambio en los caracteres de las colonias, que por decirlo así, quedan estabilizadas en el mismo tipo que tenían a tiempo de ser aisladas.

CONCLUSIONES

De los distintos métodos que se han ensayado para mantener la variante P del antígeno Vi, el que hasta hoy a dado mejor resultado, es la selección de colonias iridiscentes.

La baja temperatura a que deben mantenerse los cultivos en tubos cerrados a la lámpara, evitan la desecación e impide que las colonias se hagan avirulentas.