

## Antígenos estables para reacciones de aglutinación

Por HECTOR SOSA

En una comunicación anterior fueron tratados algunos problemas relacionados con la aplicación de las reacciones de aglutinación al diagnóstico de la fiebre tifoidea. Se dijo de la variación antigénica de las bacterias, de los antígenos constituyentes de *S. thypi* y de su relación con los otros tipos del grupo *Salmonella*; de los momentos de aparición y desarrollo de las distintas aglutininas en la enfermedad, y de su diferenciación de las producidas por acción de la vacuna antitífica; así también, de como deben aprovecharse estos conocimientos para hacer de la primitiva reacción de Widal un minucioso análisis de anticuerpos que permite llegar al diagnóstico con una precisión que alcanza a su máximo cuando, en determinaciones sucesivas, se estudia la evolución de estas aglutininas en relación con la enfermedad. (Sosa, 1934).

Para obtener tales resultados es menester emplear suspensiones constantes en sus caracteres antigénicos y capacidad de reacción. Y como éste es un problema que, a pesar del esfuerzo de los investigadores, no ha sido resuelto en forma completamente satisfactoria, se justifica la tendencia de centralizar la ejecución de estas reacciones en laboratorios especializados. Su técnica se ha hecho cada vez más difícil para el práctico que comprende mal que la tarea preparatoria, (el mantenimiento adecuado de las cepas, la preparación de los antígenos y su valorización) sea desproporcionadamente mayor que la de la reacción en sí.

En la comunicación a que se ha hecho referencia, se aconsejaba el empleo de sueros tipos, desecados en vacío, como contralores de reacción. Es más económico utilizarlos en forma indirecta, titulando sueros de enfermos que, convenientemente elegidos, sirven para la determinación inmediata del valor reactivo de las suspensiones.

Con estos sueros se ensaya la especificidad, la sensibilidad y el tiempo de reacción de las suspensiones para usar solamente las que se encuentran entre ciertos límites y, agregados como contralores en la prueba de aglutinación, permiten valorar la exactitud de los títulos hallados. Determinado un error debe renovarse la tarea; lo que ocurrirá con una frecuencia en relación inversa a la constancia de reacción del antígeno.

Vemos así, y a pesar de los adelantos en la técnica, que aún queda en pie el viejo problema de la estabilidad de las suspensiones, cuya importancia práctica induce a prestarle preferente atención.

Los antígenos propuestos por Ficker (1903) que durante mucho tiempo han sido utilizados, preparados y distribuidos por el Instituto Bacteriológico, se han mostrado muy irregulares en su comportamiento y conservación al ser ensayados bajo estas normas, y su preparación ha sido suspendida.

La misma técnica de reacción rápida en gotas, que se emplea en la actualidad, no ha sido divulgada por sus imperfecciones. En diez años de práctica se ha probado su particular adaptación a las condiciones de trabajo en el laboratorio para el que fué creada, donde se ejecutan diariamente gran cantidad de reacciones con un personal especialmente preparado. Solo así se pueden obtener buenos resultados de un método que por la rapidez de lectura permite repetir la reacción en pocos minutos, agregar series nuevas y multiplicar los contralores y los reactivos en forma de corregir los errores inherentes a las suspensiones que por su inestabilidad, a veces casi caprichosa, serían inadecuadas en condiciones y ambiente distintos.

Los antígenos alcohólicos del tipo de Bien y Zontag (1917), son relativamente estables. El alcohol diluído parece ser el mejor medio líquido para la conservación de la aglutinabilidad somática y produce buena inhibición ciliar, pero las suspensiones sufren un aumento paulatino de floculabilidad que debe vigilarse.

La técnica de Dreyer (1909), la más difundida sobre todo en territorios de habla inglesa, es también la que más se ha aproximado al desiderátum de uniformidad en los resultados. Pero, su desarrollo minucioso, los patrones de aglutinación y el factor de corrección, le prestan un sello de exactitud superior a su valor. Si su técnica es excelente y la comparación con testigos afina la apreciación del grado de aglutinación, con la aplicación de cálculos a la lectura sólo se pueden corregir en parte los defectos originales de un antígeno, y no los que sufre durante su conservación. Los ensayos efectuados con las suspensiones preparadas según la técnica de Dreyer y con las enviadas por The Standars

Laboratory de la Universidad de Oxford, demuestran que aún no se ha llegado al grado deseado de estabilidad y constancia.

En vista de los resultados obtenidos con estos y otros antígenos preparados en medios líquidos, se trató de seguir otros rumbos, pues que todo intento de mejora ha sido inútil; ya sea variando la substancia conservadora o agregando sensibilizantes que corrijan sus defectos. Considerando que los mayores inconvenientes estaban relacionados con el agua en que se suspenden las bacterias, y que a ella están ligados, la lisis, la desnaturalización por electrólitos y otros fenómenos cuya naturaleza exacta desconocemos, se intentó suprimirla.

En una comunicación previa (Sosa, 1938) ya se hizo referencia a estos ensayos y al efecto obtenido por la desecación, que permite estabilizar las condiciones de aglutinabilidad durante un tiempo que supera las exigencias.

#### ANTÍGENOS DESECADOS

Desde las primeras experiencias se ha observado que era fácil mantener la aglutinabilidad somática por desecación de las bacterias. En cambio, no ocurría lo mismo con los antígenos ciliares, que perdían capacidad de reacción frente a las aglutininas H. Esto puede explicar las diferencias notadas por Wilson (1922) trabajando con *Proteus* X 19, y los defectos de aglutinación con sueros específicos que observó al intentar preparar antígenos secos con *S. typhi*, *paratyphi* A y B, y *E. coli*.

Como la pérdida de aglutinabilidad ciliar se notara a pesar de que las bacterias conservaban su capacidad de generar las aglutininas correspondientes al ser inoculadas a animales, se pensó que podía ser debido a ruptura de las cilias por el efecto mecánico de la desecación. Se intentó, por lo tanto, aumentar su resistencia con formol, reconocido como un excelente protector de la integridad morfológica del aparato ciliar en medios acuosos.

Suspensiones de bacterias tratadas con formaldehído en distintas concentraciones y después de tiempos variables, fueron desecadas en vacío. Se notó que cuando más intenso es el proceso de fijación tanto más difícil es obtener, después, la dispersión en agua. Las bacterias endurecidas con suficiente cantidad de formol forman, al ser desecadas, un conglomerado que no se disgrega.

Se recurrió entonces al agregado de substancias amorfas, solubles en agua, que al ser desecadas preservasen a las cilias por su interposición.

Los primeros ensayos se efectuaron con glicerina y con glucosa.

nifiestan más intensos con ciertos tiempos para atenuarse con un calentamiento más prolongado. Es posible que esto sea debido a pequeños cambios físicos ocurridos en los distintos elementos que entran en la reacción, que se alternan en sus efectos.

Con los antisépticos se obtienen resultados más constantes que con el calor, especialmente con cloroformo, formol y bicianuro de mercurio, que deben emplearse en la mínima cantidad necesaria para esterilizar las suspensiones que van a ser desecadas. Los límites de concentración y tiempo no son especificados por su variabilidad con respecto al medio de cultivo empleado, a la técnica de recolección, y hasta al método de desecación. Es conveniente hacer un ensayo previo para determinar la mejor concentración en las condiciones en que se trabaja; teniendo presente, que un exceso de formol dificulta la suspensión del antígeno desecado, que el bicianuro de mercurio aumenta la floculabilidad inespecífica, y que las suspensiones mantenidas con cloroformo se lisan fácilmente.

#### ANTÍGENO SECO GLUCOSADO (ESTERILIZADO CON CLOROFORMO)

Entre los distintos antígenos obtenidos por desecación de suspensiones de bacterias ciliadas, uno merece especial referencia. No por considerarlo como punto final de estas investigaciones, sino como el primero cuyos resultados han sido realmente alentadores, y por ser el único que ha podido controlarse después de casi diez años de conservación. Fué preparado el 15 de noviembre de 1932 y, guardado a temperatura ambiente, mantiene las características antigénicas que poseía al ser desecado.

Se utilizó la cepa *S. typhi* H 901 de Félix, que por selección de colonias era mantenida en forma francamente S y bien ciliada. Partiendo de un cultivo de 18 h, sobre agar en estría, se efectuaron siembras en caldo; y con este caldo, a las 6 h. de desarrollo, fueron sembrados los frascos de agar. Como medio nutritivo se empleó caldo de carne peptonizado al 2 %, con un pH 7,4, al que se agregaba 2 % de agar para obtener los medios sólidos. Todas las incubaciones fueron efectuadas a 37°C.

La recolección se realizó después de 18 h. de desarrollo. A la mitad de los frascos se agregó la mínima cantidad de solución fisiológica (CINa 0,8 %) necesaria para cubrir el agar y se dejó que la suspensión se efectuara espontáneamente, favoreciendo un poco el desprendimiento con ligeras inclinaciones. Con el líquido recogido se repitió la operación en la segunda serie de frascos, con el objeto de obtener una suspensión con gran cantidad de bacterias, que fué medida y titulada por nefelometría.

Calculada la cantidad de solución fisiológica necesaria para obtener  $250 \times 10^9$  bacterias por ml, ésta fué agregada con un exceso de cloroformo puesto previamente en suspensión por agitación enérgica. La mezcla fué mantenida por rotación moderada durante un minuto, dejando sedimentar después el cloroformo.

A la suspensión decantada se incorporó su volumen de una solución de glucosa al 40 %, a los 15 minutos de iniciado el contacto con el cloroformo. Se mezcló bien, se retiró una cantidad para contralor y pruebas comparativas, y el resto se distribuyó en ampollas a razón de 0,2 ml en cada una. Para ello se empleó una pipeta automática construída de acuerdo a las indicaciones de Ayling.

Las ampollas fueron expuestas inmediatamente al vacío sulfúrico, obtenido en desecador de vidrio y con bomba rotativa de aceite de alto vacío. Después de 20 h. fueron retiradas y cerradas a la lámpara, permaneciendo desde entonces, a temperatura ambiente, en un cajón de la mesa de trabajo.

#### CONCLUSIONES

Todas las suspensiones de bacterias en medios líquidos, que fueron ensayadas, se han mostrado inconstantes o conservan mal sus caracteres antigénicos y capacidad de reacción. En vista de estos resultados se ha estudiado la desecación como medio de obtener antígenos estables para reacciones de aglutinación.

Con las bacterias inmóviles no se ha encontrado dificultades para obtener antígenos secos. Los gérmenes ciliados, en cambio, pierden aglutinabilidad al ser desecados.

Este defecto puede ser corregido con la interposición de sustancias que preservan de alteración a las ciliadas durante el proceso de desecación.

Se describe la preparación de un antígeno que conserva sus caracteres antigénicos después de haber sido mantenido casi diez años a temperatura ambiente.

#### BIBLIOGRAFIA

- BIEN Z.: 1924. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, 93: 196.  
BIEN Z. y SONTAG: 1917. *Munch. med. Wschr.* 64: 1409.  
DREYER G.: 1909. *J. Path. Bact.*, 13: 331.  
FICKER M.: 1903. *Berl. klin. Wschr.*, 40: 1021.  
GREAVES R. I. N. y ADAIR M. E.: *J. Hyg.*, 39: 413.  
SOSA H.: 1934. *Folia Biol.*, N° 42-45: 185.  
SOSA H.: 1938. 7ª Reunión del Inst. Bact. Dep. Nac. de Hig.  
WILSON W. J.: 1922. *Lancet*, 202: 222.