

## El antígeno glúcido-lípido como fijador de complemento

### I - EN BRUCELLA

Por I. PIROSKY, R. de PIROSKY y N. V. D'ALESSANDRO

---

La sensibilidad y especificidad demostradas por el antígeno bacteriano de naturaleza glúcido-lípida en las reacciones de aglutinación y precipitación, nos ha inducido a examinar el valor de este antígeno en un sistema de fijación de complemento.

En este trabajo nos ocupamos del caso particular del antígeno glúcido-lípido de *Brucella*; exponemos las características fijadoras de complemento correspondientes al complejo constituido por dicho antígeno y el anticuerpo contenido en el suero de animales inmunizados experimentalmente o de enfermos de brucelosis y nos referimos al aspecto experimental del sistema sin entrar a considerar su posible valor de aplicación.

Diversos antígenos han sido empleados en reacciones de fijación de complemento con fines de diagnóstico aplicados a la brucelosis. TAYLOR, LISBONNE, VIDAL y HAZEMÁN (1) han utilizado suspensiones de bacterias muertas por calor; MORALES-OTERO y GONZÁLEZ (2) una proteína bacteriana extraída en medio alcalino; FERNÁNDEZ ITHURRAT (3), dicho antígeno modificado, e HIGGINBOTHAN y HEATHMANN (4), un polisacárido extraído de cultivos en medio líquido.

#### I. — MATERIAL Y TÉCNICA

1. *Antígeno*. — Se obtuvo de acuerdo a la técnica descrita por BOIVIN y MESROBEANU (5). Un cultivo de 72 horas en medio sólido de Stafseth, suspendido en solución de NaCl al 0,9 %, lavado tres veces consecutivas, se lo trata con ácido tricloroacético N/4. El residuo es separado por centrifugación y el sobrenadante es dializado hasta eliminación del ácido. Filtración por bujía.

De acuerdo a esta técnica se prepararon antígenos de los tres tipos de *Brucella* (abortus 590, melitensis 31 y suis 305). Los antígenos glúcido-lípidos así obtenidos presentaron en cuanto al elivaje en medio ácido, toxicidad y valor antigénico (formación de anticuerpos de coagulación), las mismas características establecidas por LISBONNE (6) y DOMBOVICEANU (7).

2. *Sueros*. — Se emplearon: A. sueros de conejos inmunizados experimentalmente y B. sueros de brucelosos.

A. *sueros de conejos inmunizados experimentalmente*. — Se prepararon por inoculación de:  $\alpha$ . suspensiones de bacterias;  $\beta$ . solución de antígeno glúcido-lípido.

$\alpha$ . *sueros anti-bacterianos*. — Fueron obtenidos con cada uno de los tipos de *Brucella* ya indicados. Un cultivo de 72 horas en agar hígado, suspendido en solución fisiológica, es lavado tres veces por centrifugación e inactivado 1/2 hora a 60°C. Se añade fenol 0,5 %. Los animales fueron inoculados por vía venosa con 0,5 — 1, — y 1,5 ml. de una suspensión de  $5 \times 10^9$  bacterias por ml. Las inyecciones se realizaron cada tres días y la sangría definitiva se efectuó ocho días después de la última inyección.

$\beta$ . *sueros anti-glúcido-lípido*. — Se obtuvieron por inoculación intravenosa de los antígenos glúcido-lípidos extraídos de cada uno de los tipos de *Brucella* ya citados. Se inyectó 0,5 — 1, — y 1,5 ml. de una solución al milésimo (peso seco). Los intervalos de las inoculaciones y de las sangrías fueron iguales a las indicadas en el párrafo anterior.

B. *Sueros de brucelosos*. — Se han estudiado sueros de enfermos con infección brucelosa o de sujetos curados clínicamente. (1).

3. *Complemento*. — Suero fresco de cobayo diluído 1/20. Previamente a la ejecución de la reacción se determinó la dosis hemolítica mínima (d.h.m.) frente a la dosis máxima de antígeno utilizada en el sistema. La variación de la concentración del antígeno dentro de un mismo sistema entre 1 y 400 gamas, no influye sobre el valor de la d.h.m. de complemento. Se ha empleado en general  $1 \frac{1}{4}$  d.h.m.

4. *Sistema hemolítico*. — Se constituyó por partes alícuotas de una suspensión al 10 % de glóbulos de carnero y amboceptor. Un ml. de la misma contiene 5 D.H.

(\*) Este material nos ha sido facilitado por la sección Estudios Epidemiológicos del Instituto, a cuyo jefe, Dr. E. A. MOLINELLI, agradecemos esta colaboración.

5. *Reacción.* — Los elementos de la reacción se agregaron en el orden siguiente: 0,1 ml. de suero (inactivado a 56°C, durante 1/2 hora); 0,1 ml. de la solución del antígeno, complemento, solución fisiológica hasta completar un volumen de 1 ml. Incubación en baño de agua a 37°C durante 1 hora, a cuyo término se añade 1 ml. de la mezcla hemolítica sensibilizada previamente a 37°C durante 5 minutos. La lectura del sistema se realiza cuando en el tubo control, constituido por anticuerpo y complemento aparece la hemólisis completa.

La nomenclatura de los grados de hemólisis en los diferentes protocolos se expresa por: pH = poca hemólisis; 1/4, 1/2 y 3/4 = grados de hemólisis; CH = casi hemólisis y 0 = ausencia de hemólisis.

RESULTADOS

A. CON SUEROS DE INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL. — 1. *Zona óptima de fijación.* — Los sueros anti-glúcido-lípidos y anti-bacterianos han demostrado que el complejo antígeno-anticuerpo (con anticuerpo constante) que se forma en ambos casos, presenta una zona óptima de fijación de complemento para cantidades de antígeno que se extienden más allá de 80 hasta 0,2 de gamas. (Protocolo N° 1).

PROTOCOLO N° 1

FIJACIÓN DE COMPLEMENTO - BRUCELLA																										
Suero conejo anti-suis	Antígeno glucido-lípido (cantidades en γ)																									
	B. abortus				B. melitensis				B. suis				C													
	80	40	20	10	5	1	0.2	0.01	80	40	20	10		5	1	0.2	0.01	80	40	20	10	5	1	0.2	0.01	
Anti-bacteriano	0.1	0	0	0	0	0	0	pH H	1/4	pH	pH	0	0	0	0	H	pH	0	0	0	0	0	pH	H	H	
	0.02	pH	0	0	0	0	0	pH H	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	pH	0	0	H	pH	0	0	0	0	0	0	H	H
	0.005	1/4	1/4	1/4	pH	pH	0	pH cH	3/4	3/4	3/4	3/4	1/2	1/4	pH	H	1/4	1/4	1/4	pH	0	0	0	cH	H	
Anti-gluc.	0.1	0	0	0	0	0	0	pH H	1/4	pH	0	0	0	0	pH	H	1/2	0	0	0	0	0	pH	H	H	
	0.02	pH	0	0	0	0	0	pH H	1/4	1/4	1/4	0	0	0	pH	H	1/2	0	0	0	0	0	pH	H	H	
lip.	0.005	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	pH	pH H	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	H	3/4	1/4	1/4	pH	pH	pH	pH	H	H	

La concentración en anticuerpos es prácticamente la misma en ambos tipos de sueros.

2. *Especificidad.*— La reacción es específica para *Brucella*. Los resultados negativos obtenidos con antígenos glúcidos-lípidos extraídos de bacterias pertenecientes a otros géneros y con sueros que no tienen relación con brucelosis, así lo corroboran.

3. *Diferenciación de los factores A y M.*— La estructura antigénica de los tres tipos de *Brucella*, estaría condicionada por la proporción, en cada uno de ellos, de los factores A y M. (WILSON y MILES) (8). El factor A sería predominante en los tipos abortus y suis y el factor M en el tipo melitensis.

Hemos intentado investigar en qué medida dichos factores se hallaban distribuidos en la fracción glúcido-lípido de la bacteria. En los sistemas de fijación de complemento realizados, los sueros de conejo anti-abortus y anti-melitensis han demostrado combinarse con los antígenos glúcidos lípidos homólogos y heterólogos con igual amplitud. No se han observado diferencias apreciables de valores entre los sueros obtenidos por inmunización con los respectivos antígenos glúcido-lípidos o con las suspensiones bacterianas. La capacidad de inducir a la formación de los anticuerpos  $\alpha$  y  $\mu$  es compartida al parecer por igual por la bacteria « in toto » y por la fracción glúcido-lípida obtenida de la misma, sin tener en cuenta por supuesto, anticuerpos formados, en el primer caso, para otras fracciones antigénicas de la bacteria. En ambos tipos de sueros (anti-glúcido-lípido o anti-bacteriano), sólo al comienzo de la inmunización y en el límite de concentración de los anticuerpos, ha podido observarse cierta diferenciación de los receptores específicos. Esta circunstancia estaría condicionada por la naturaleza antigénica de las cepas empleadas. Si los factores A y M tienen igual valor antigénico y  $\alpha$  y  $\mu$  son receptores de igual avidéz, (MILES) (9), debemos concluir que la proporción de las superficies A y M en los antígenos empleados para la inmunización de los conejos (se trate de la bacteria o de la solución del complejo glúcido-lípido) es del orden de la unidad. (Esta observación parece justificada a pesar de no haberse realizado experiencias de absorción).

B. CON SUEROS DE BRUCELOSOS. — 1. *Zona óptima de fijación.*— Numerosas reacciones realizadas con sueros de enfermo bruceლოს (en actividad o clínicamente curados) han permitido observar una zona de fijación para variadas cantidades de antígeno, cuya amplitud está en función de la concentración de anti-cuerpos en el suero. Se observa una pre y post zonas de hemólisis en relación con el exceso de antígeno o de anticuerpo.

PROTOCOLO N° 2

ANTÍGENO GLUCIDO - LÍPIDO (cantidades en gamas)																												
Suero humano Prot.: 59867 Hud.: 1/25	B. abortus								B. melitensis								B. suis								C			
	80	40	20	10	5	1	2	.04	.02	80	40	20	10	5	1	2	.04	.02	80	40	20	10	5	1		2	.04	.02
c.c.:																												
0.1	H	H	H	H	cH	pH	pH	cH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	pH	pH	cH	H	H	H
0.05	H	H	H	H	H	cH	cH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
0.02	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
0.01	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

PROTOCOLO N° 3

ANTÍGENO GLUCIDO - LÍPIDO (cantidades en gamas)																												
Suero humano Prot.: 59960 Hud.: 1/500	B. abortus								B. melitensis								B. suis								C			
	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02		.005	.001	.0002
c.c.:																												
0.05	0	0	0	0	0	0	pH	cH	cH	H	H	H	cH	H	H	H	H	H	0	0	0	0	0	0	0	H	H	H
0.02	0	0	0	0	0	0	pH	cH	H	H	H	H	cH	cH	H	H	H	H	0	0	0	0	0	0	0	cH	cH	H
0.01	pH	pH	0	0	0	0	pH	H	H	H	H	H	H	cH	H	H	H	H	0	0	0	0	0	0	0	cH	cH	H

PROTOCOLO N° 4

ANTÍGENO GLUCIDO - LÍPIDO (cantidades en gamas)														C																			
Suero humano Prot.: 59977	B. abortue					B. melitensis					B. suis																						
	c.c.:	400	200	100	40	10	1	.2	.02	.002	.0002	.00002	400	200	100	40	10	1	.2	.02	.002	.0002	.00002	400	200	100	40	10	1	.2	.02	.002	.0002
0.05	pH	0	0	0	0	0	0	0	H	H	H	H	0	0	0	0	0	0	0	pH	H	cH	0	0	0	0	0	0	0	cH	H	H	H
0.002	H	H	H	H	H	0	0	0	H	H	H	H	H	H	H	1/4	0	0	0	0	H	H	H	H	1/2	0	0	0	3/4	H	H	H	H
0.0005	H	H	H	H	H	pH	pH	H	H	H	H	H	H	H	H	cH	pH	0	0	0	cH	H	H	H	H	1/2	0	pH	H	H	H	H	
0.00025	H	H	H	H	H	H	cH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1/4	1/4	1/4	cH	H	H	H	H	H	H	cH	cH	H	H	H	
0.0001	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

PROTOCOLO N° 5

ANTÍGENO GLUCIDO - LÍPIDO (cantidades en gamas)														C																
Suero humano Prot.: 59961 Hud.: 1/200	B. abortus					B. melitensis					B. suis																			
	c.c.:	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002		
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	H	H	0	0	0	0	0	0	0	0	1/4	H	0	0	0	0	0	0	0	3/4	H	H
0.05	1/2	1/2	1/2	0	0	pH	pH	cH	H	1/4	1/2	0	0	0	0	0	0	1/4	3/4	pH	pH	H	p	0	0	0	pH	H	H	H
0.02	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	3/4	3/4	cH	H	cH	cH	pH	0	0	0	0	1/2	H	H	H	cH	pH	pH	pH	1/4	H	H	H		
0.01	cH	cH	cH	cH	cH	cH	H	H	H	H	H	H	pH	0	0	0	1/2	H	H	H	cH	1/2	3/4	cH	H	H	H			

PROTOCOLO N° 6

		ANTIGENO GLUCIDO-LÍPIDO																												
		(cantidades en gamas)																												
Suero humano Prot.: 59926 Hud.: neg.	c.c.:	B. abartus								B. melitensis								B. suis								C				
		100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02	.005	.001	.0002	100	50	10	1	.2	.02		.005	.001	.0002	
0.05		1/2	1/2	0	0	0	0	0	H	H	H	H	cH	0	0	0	0	0	cH	H	0	0	0	0	0	0	1/2	H	H	H
0.02		H	1/2	0	0	0	0	0	cH	H	H	H	H	3/4	1/4	0	0	0	H	H	H	H	0	0	0	0	0	H	H	H
0.01		H	H	1/2	0	0	0	0	cH	H	H	H	H	H	cH	3/4	3/4	0	cH	H	H	H	1/2	0	0	0	0	cH	H	H

Para los sueros con bajo contenido en anticuerpos, la concentración óptima de antígeno, para el caso de fijación de complemento con anticuerpo constante, es alrededor de 1 gama, oscilando entre 10 y 0,02 de gama. (Protocolo N° 2).

Cuando el contenido en anticuerpos es elevado, los complejos antígeno-anticuerpo fijadores de complemento (siempre con anticuerpo constante) pueden hallarse comprendidos entre cantidades de antígenos de 400 y 0,0002 de gamas. (Protocolo N° 4). La dilución progresiva de este tipo de suero da por resultado una disminución correlativa de la zona de fijación, hasta quedar reducida, en el límite de la concentración útil del anticuerpo, al valor observado en los sueros originalmente con bajo título. Esta zona de fijación, que hemos visto, se halla comprendida entre 10 y 0,02 gamas de antígeno, indicaría la concentración óptima de antígeno capaz de sensibilizarse por un mínimo de anticuerpo. Esta relación antígeno-anticuerpo es constante para un mismo suero examinado en diferentes oportunidades y para un mismo antígeno obtenido en diversas extracciones y ha sido observada regularmente en todos los casos hasta ahora estudiados. (En la fecha, más de cuatrocientos sueros).

2. *Diferenciación de los factores A y M.* — Contrariamente a lo observado en los sueros de conejos, dada la naturaleza de las cepas utilizadas en esas experiencias, en los sueros de brucelosos se observa un contenido variable en ambos tipos de anticuerpos, en función probablemente con la diferente proporción de los factores A y M en la cepa infectante.

La reacción de fijación de complemento realizada con los antígenos glúcido-lípidos abortus, melitensis y suis, nos ha permitido por simple dilución del suero, diferenciar en gran número de casos, los receptores  $\alpha$  y  $\mu$ .

Así, se han observado sueros monoespecíficos con elevado o bajo contenido en anticuerpos  $\alpha$  (Protocolos 2 y 3); sueros con diferente contenido en anticuerpos  $\alpha$  y  $\mu$  (Protocolos N° 4, 5 y 6) predominando en los N° 4 y 5 el receptor  $\mu$  y en el N° 6 el receptor  $\alpha$ , y aquellos que siendo monoespecíficos en el comienzo de la infección pasan a ser heterólogos en el transcurso de la misma, pero con desigual contenido de ambos receptores. Por último, existen sueros heterólogos indiferenciables por dilución, en cuanto a los receptores específicos se refiere. En el caso de los sueros monoespecíficos con elevado contenido en un tipo de anticuerpo, debe tenerse presente que el receptor opuesto puede hallarse ausente o existir en una concentración inferior a la sensibilidad de la reacción.

La diferenciación de los receptores  $\alpha$  y  $\mu$  mediante los antígenos glúcido-lípidos permite aceptar que los componentes A y M están por lo menos parcialmente implícitos en esta fracción de la bacteria.

*Necesidad de la integridad del complejo glúcido-lípido.*—Las fracciones polisacárido y lípido que se obtienen por clivaje del complejo en medio débilmente ácido (ácido acético N/125) no constituyen con el anticuerpo específico complejos fijadores de complemento. Tampoco lo realiza la mezcla de ambas fracciones.

Hemos investigado si el polisacárido o la fracción lipoidea, pudiesen funcionar como haptenes en un tipo de reacción de inhibición dentro de un sistema fijador de complemento. Ello ha sido estudiado en el límite de concentración del anticuerpo. Los resultados han sido negativos.

#### RESUMEN

Se ha examinado un sistema fijador de complemento con un antígeno de naturaleza glúcido-lípida.

En las condiciones analizadas el antígeno glúcido-lípido de *Brucella* ha demostrado ser específico; cantidades del antígeno del orden de una gama, dan lugar regularmente, frente al anticuerpo específico, a la formación de complejos fijadores de complemento.

La naturaleza relativamente simple del antígeno estudiado, así como su especificidad y sensibilidad, permiten suponer sea útil para establecer una reacción con fines diagnósticos, así como para el estudio cuantitativo de un sistema fijador de complemento.

#### BIBLIOGRAFIA

1. TAYLOR, R. M., LISBONNE, M., VIDAL, L. F. y HAZEMAN, R. H., *Quarterly Bulletin of the Health Section of the League of Nations*. Vol. VII, Nº 3, pág. 503.
2. MORALES-OTERO, P. y GONZÁLEZ, L. M., *Amer. Journ. of Med. Sc.* Vol. 299, 1940, págs. 810-814.
3. FERNÁNDEZ ITHURRAT, *Día Médico*. Vol. 11, 1939, págs. 283-286.
4. HIGGINBOTHAM, M. y HEATHMAN, L. S., *Journ. of Inf. Dis.* Vol. 59, 1936, págs. 30-34.
5. BOIVIN, A. y MESROBEANU, L., *C. R. Soc. Biol.* Vol. 112, 1933, pág. 76.
6. LISBONNE y MONIER, *C. R. Soc. Biol.* Vol. 123, 1936, págs. 1114-1116.
7. DOMBOVICIANU, A., BARBEC, POP, A. y MARINOV, I., *C. R. Soc. Biol.* Vol. 127, 1938, págs. 733-736.
8. WILSON, G. S. y MILES, A. A., *British Journ. Exp. Path.* Vol. 13, 1932, pág. 1.
9. MILES, A. A., *The British Jour. of Exp. Path.* Vol. XX, Nº 1, 1939, pág. 63.