

Las aglutininas del suero anticarbuncloso

Por A. Sordelli, P. Beltrami y C. Harispe

Las propiedades aglutinantes del suero anticarbuncloso han sido muy discutidas, sea ya porque el antígeno era poco apto para la observación del fenómeno, sea porque los sueros específicos no aglutinaban o los normales aglutinasen. Un resumen de la literatura sobre este asunto (Kolle y Wasserman, t, III, pág. 688, Milzbrand G. Soberheim), revela las contradicciones más extraordinarias.

Arlyle Noble ⁽¹⁾ describe un método que permite observar fácilmente el fenómeno con los sueros específicos. Consiste en el uso de una emulsión homogénea de bacilos no esporulados obtenidos por un cultivo de pocas horas en agar, de una cepa que ha sido cultivado a 42°.5 durante 10 días.

Los sueros específicos aglutinan hasta la dilución de 1/20.000. El suero normal aglutina solo hasta 1/200.

Brocq Rousseau, Staub y Urbain ⁽²⁾ encuentran también que el suero anticarbuncloso tiene poder aglutinante hasta el título de 1/50.000. No indican la técnica usada para la determinación, lo que nos hace suponer que se trata de un ensayo realizado en la forma corriente.

En esta comunicación nos ocuparemos de las aglutininas contenidas en el suero anticarbuncloso preparado en la forma descrita en la comunicación primera (pág. 352).

Las primeras tentativas fueron para obtener una suspensión homogénea de *B. anthracis* homogenizando con NaOH N/100 y neutralizando con HCl. Como la suspensión fuera menos estable después del tratamiento nos vimos obligados a suprimir la neutralización por el ácido, suspendiendo los gérmenes en NaOH N/100 centrifugando y emulsionando el sedimento con solución fisiológica.

Las emulsiones así preparadas no fueron nunca tan homogéneas como es habitual usar para la aglutinación decidiendo

abandonar el método y recurrir al empleo de suspensiones de *B. anthracis* en solución fisiológica sin tratamiento previo.

El *B. anthracis* fué cultivado en agar-suero por 18-24 horas y emulsionado en solución fisiológica hasta una opacidad correspondiente a 7000 millones por cm.³

La suspensión se deja por algunas horas a la temperatura ambiente. Puede ser utilizada al día siguiente y aun a las 48 horas después de la preparación. Su sensibilidad a la aglutinación es menor en este tiempo.

La aglutinación se hace en tubos de 160 mm. por 16 mm. colocando 0.3 - 5 cm.³ de la dilución del suero y un volumen igual de la suspensión de gérmenes. Se agita el contenido inclinando los tubos de manera que el líquido corra por la pared y luego vuelva al fondo.

En esta forma los gérmenes ruedan por la pared y se aglomeran rápidamente en grumos. Es fácil observar cuando hay aglutinación que una gran parte de los gérmenes queda adherida a la pared del tubo y el líquido se aclara no sólo por la formación de grumos gruesos, sino también por aquella causa.

El tiempo de observación es de 1/2 hora a temperatura ambiente inclinando los tubos en este tiempo más o menos unas 40 veces. El calentamiento favorece la aparición del fenómeno, pero siendo tan claro a temperatura de laboratorio, hemos realizado todos los ensayos a 17° - 22°. Como controles se han usado sueros colérico y tífico comparando siempre la aglutinación con una concentración mucho mayor de estos sueros que la del suero específico.

El fenómeno de aglutinación aparece casi instantáneamente cuando la concentración del suero es muy grande.

Nuestros ensayos fueron hechos con cepas avirulentas, Vac. I, Vac. II y gérmenes virulentos y todas fueron aglutinadas, (ver protocolo siguiente). Las diferencias individuales son bastante marcadas, pero no hemos podido apreciar por el momento si el fenómeno puede servir para dividir el *B. anthracis* en tipos.

La aglutinabilidad ha sido tanto mayor cuanto menor era la virulencia de la cepa. Si el hecho es debido a circunstancias fortuitas o a una propiedad constante y general, no se ha podido establecer de una manera categórica.

El suero usado fué preparado por inmunización de caballos con la cepa virulenta Will.

Aglutinación de gérmenes avirulentos y Vac. I.

Suero 533 (Sangría 17 - VIII - 1928)

Tipo	1/300	1/900	1/2700	1/8100	1/24300	Control suero tífico 1/300	Precipitación con el líquido sobrenadante
1) I. S. 9.....	++++	++++	++	++	±	-	+++
2) I. S. 8.....	++++	++++	+++	+++	±	-	+++
3) Ros.....	+++	+++	++	+	±	-	+++
4) Pasteur 1927.	++	++	+	±	-	-	+++
5) Orig.....	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++
6) Ag. I.....	++++	++++	++++	++++	+	+	+++
7) Ag. Muc....	++++	++++	++++	++++	±	+	+++
8) Lau.....	++++	++++	++++	++	-	-	+++

Naturaleza y virulencia de la cepa

	Patógena para
1) Vacuna I. Carbunclo de campo atenuado por calor	Ratón
2) » I. » » » » »	»
3) » I.	»
4) » I.	Conejo
5) » I. Carbunclo de capo atenuado por calor	Ratón
6) Carbunclo atenuado	»
7) » »	Cobaya
8) Carbunclo atenuado por pasaje en organismo inmune	Ratón

Aglutinación de Vacuna II

Suero 533 (Sangría 17 - VIII - 1928)

Tipo	1/300	1/900	1/2700	1/8100	1/24300	Control suero tífico 1/300	Precipitación con el líquido sobrenadante
1) I. B.	++++	+++	++	+	-	-	++
2) U. D.....	+	-	-	-	-	+	-
3) Ri.....	++	+	+	±	-	-	+++
4) P. 27.....	++++	++++	+++	++	+	-	++
5) P. 24.....	+++	+++	++	+	-	-	+++
6) Ha.....	++++	++++	++++	+++	++	-	+
7) L. A.....	++++	++++	++++	++	+	-	+
8) 0.60.....	++++	+++	+++	+	+	-	+
9) P. 28.....	++++	+++	+++	+	+	-	++

Naturaleza y virulencia de la cepa

Patógena para

1) Vacuna II. Carbunco de campo atenuado por calor	Cobaya
2) No es carbunco.	
3) Vacuna II.	
4) » II.	Cobaya
5) » II.	»
6) » II.	»
7) » II. Carbunco de campo atenuado por calor.	Cobaya
8) » II. » » » » »	»
9) » II.	Cobaya

Aglutinación del carbunco virulento

Suero 533 (Sangría 17 - VIII - 1928)

Cepa	1/300	1.900	1/2700	1.8100	Tífico 1/500	Precipitación con el líquido sobreradante
Co.....	++	++	+	-	+	++
Ro.....	+++	+++	+++	-	-	++
Ra.....	+++	+++	++	-	+	++
Li.....	-	-	-	-	-	++
Ro II.....	+++	+++	+++	-	-	++
Po.....	++	++	++	-	+	++
M. P.....	++	++	+	-	+	++
Ga I.....	++	++	+	-	-	++
Will.....	++	++	+	-	+	++
Lel. I.....	++	++	+	-	+	++
Ber.....	++	++	+	-	+	++
Lel. II.....	++	++	+	-	+	++
Per.....	++++	++++	++++	++++	-	++
Ro I.....	+++	+++	++	+	-	++
Ga V.....	++	++	-	-	+	++
Lel. III.....	++	++	+	-	-	++
Ga II.....	++	++	+	-	-	++
Gan.....	+++	+++	++	++	-	++
Ga III.....	++	++	+	-	-	++

En esta serie se pueden observar dos cepas que difieren totalmente de las demás; la cepa Li y la Per. La primera no ha sido aglutinable en ninguna concentración y la segunda lo ha sido de una manera extraordinaria.

Este comportamiento es el único indicio de que puede existir una diferencia de constitución antigénica entre las diferentes cepas de *B. anthracis*.

La especificidad del fenómeno de aglutinación fué establecida por comparación con sueros antifífico, anticolérico y antipestoso y con gérmenes semejantes al carbunco.

Con los sueros no específicos el límite de aglutinación es muy bajo.

El suero anticarbuncloso aglutinó los pseudo anthracis a un título muy bajo e igual al del suero tífico.

II

Durante la inmunización se ha podido apreciar la elevación del título aglutinante paralelamente a la aparición de precipitinas, como puede verse en el protocolo siguiente.

Suero	Sangría exploratriz 8 - IX - 27			Sangría exploratriz 2 - I - 28			Sangría exploratriz 30 - IV - 28		
	Precipita- ción	Aglutinación		Precipita- ción	Aglutinación		Precipita- ción	Aglutinación	
		1/30	1/100		1/30	1/100		1/30	1/100
533	0	0	0	+	+	0	+++	++	++
535	0	0	0	++	+	0	+++	++	++
538	0	0	0	+	0	0	+++	++	++
541	0	0	0	0	±	0	+++	++	++
560	0	0	0	0	±	0	++	++	++

El paralelismo entre las propiedades precipitantes y aglutinantes induce a creer que ambos fenómenos tengan un mecanismo semejante como ha sido imaginado por Paltauf. En realidad no hay ningún argumento que derivado de estos experimentos pueda servir para negar tal posibilidad. La diferencia mayor entre ambos fenómenos es la de los límites de precipitación y aglutinación. Tampoco es esta diferencia de muy grande importancia, pues la estabilidad de la emulsión bacteriana es tan inferior a la del precipitinógeno que puede ser esta la causa de que la aglutinación se observe con una dilución mucho menor de suero.

III

El fraccionamiento con agua destilada y CO₂ ha permitido separar el suero en dos partes, la insoluble conteniendo todas las aglutininas y la soluble desprovista de toda actividad.

Las globulinas insolubles en H₂O destilada, contienen los anticuerpos coagulantes (precipitinas y aglutininas) y al mismo tiempo los que protegen de la infección al conejo y a la doblaya.

En el protocolo siguiente puede verse la distribución de las aglutininas entre las albúminas + globulinas solubles y las globulinas insolubles.

Aglutinación con los sueros 850,851 y sus fracciones

1 cm.³ de suero + 9 cm.³ de agua destilada saturada de anhídrido carbónico.

El precipitado se separa por centrifugación y se disuelve en 10 cm.³ de solución fisiológica. Como antígeno se usa una suspensión de *B. anthracis* virulento (Cepa Will) en solución fisiológica previa digestión con NaOH; centrifugación y lavado.

Dilución del suero	SUERO 850			SUERO 851		
	Suero total	Albúmina + globulinas solubles	Globulinas insolubles	Suero total	Albúmina + globulinas solubles	Globulinas insolubles
1/20	+	+	+	+	+	+
1/40	+	0	+	+	±	+
1/80	+	0	+	+	0	+
1/160	+	0	+	+	0	+
1/320	+	0	+	+	0	+
1/640	+	0	+	+	0	+
1/1280	+	0	±	+	0	0
1/2560	±	0		±	0	0

IV

La absorción de aglutininas fué ensayada con dos cepas de Vacuna I y dos cepas de Vacuna II.

En 2 cm.³ de suero anticarbuncloso 533 diluido se emulsionan 2 ansas de un cultivo de 24 horas en agar suero. Se deja esta

emulsión a 37° durante dos horas y se centrifuga. En el líquido sobrenadante se determinan las aglutininas.

		Suero 533 sin digerir.			
		1/100	1/1000		
Vac. I (O)		++	++		
Vac. I (L)		++	+		
Vac. II (P)		+++	+		
Vac. II (H)		++	+		
Suero 533 digerido con Vac. I (O)		Suero 533 digerido con Vac. I (L)			
		1/100		1/100	
Vac. I (O)		+		Vac. I (O)	+
Vac. I (L)		0		Vac. I (L)	0
Vac. II (P)		0		Vac. II (P)	0
Vac. II (H)		0		Vac. II (H)	0
Suero 533 digerido con Vac. II (P)		Suero 533 digerido con Vac. II (H)			
		1/100		1/100	
Vac. I (O)		+		Vac. I (O)	+
Vac. I (L)		0		Vac. I (L)	0
Vac. II (P)		0		Vac. II (P)	0
Vac. II (H)		0		Vac. II (H)	0

La absorción ha sido completa para las cepas L, P y H. En cuanto a la cepa O parece que una tendencia muy grande a la aglutinación sea la causa de los resultados observados.

Téngase presente que la digestión con la misma cepa O deja en el líquido una cantidad de aglutininas para producir la aglutinación en la dilución del 1 %.

CONCLUSIONES

El suero anticarbuncloso obtenido por inmunización por vía venosa con *B. anthracis* capsulado tiene propiedades aglutinantes específicas y la actividad del suero es muy grande y comparable a la de los más activos sueros aglutinantes.

La aglutinación puede observarse fácilmente con emulsiones en solución fisiológica de *B. anthracis* cultivado en agar suero a 37° por 24 horas.

Con excepción de una cepa de carbunco virulento (Li), 19 cepas virulentas, 8 de vacuna II y 7 de vacuna I han aglutinado a título variables pero que no permiten deducir una disociación del *B. anthracis*.

El líquido de emulsión de todas las 35 cepas, incluso la inaglutinable, contiene precipitinógeno.

El título aglutinante se eleva paralelamente al poder precipitante. Los sueros de los cinco animales que fueron estudiados contienen aglutininas.

El fraccionamiento con agua destilada y CO₂ permite separar en la fracción insoluble las aglutininas. El líquido sobrenadante no tiene actividad.

La absorción de aglutininas es fácil de poner en evidencia. El método de Castellani no permite apreciar diferencias entre cuatro cepas, dos de Vacuna 1ª y dos de Vacuna 2ª