

# ESTUDIOS SEROLOGICOS EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON MICROORGANISMOS DEL GENERO AEROMONAS

Por

ANDRÉS SORIANO LLERAS \*

RAMIRO MARTÍNEZ SILVA \*\*

## INTRODUCCIÓN

En un artículo previo (1) se han comunicado los resultados serológicos obtenidos en conejos adultos, que habían sido infectados con gérmenes del género *Aeromonas*, en lo referente al momento de la aparición de anticuerpos y su evolución posterior.

En el artículo actual publicamos los datos relativos a la persistencia de esos anticuerpos después de un largo período de reposo; la influencia que sobre ellos ejerce, la administración de suspensiones bacterianas de estructura antigénica varia, pero distinta a la que posee la cepa de *Aeromonas sp.*, utilizada en esta experiencia; y, por último, características de la respuesta secundaria, después de una nueva infección.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado conejos infectados experimentalmente con la cepa número 461 de *Aeromonas sp.*, cuyos resul-

tados, en la respuesta primaria, han sido comunicados ya.

Estos conejos, que habían recibido tres inyecciones de la suspensión de gérmenes vivos, a lo largo de un período de veintitrés días, fueron estudiados en su respuesta inmunológica durante setenta días, dejándolos en reposo hasta que se cumplieron seis meses de la primera inoculación del germen. En ese momento se hizo una sangría de control para conocer los niveles de anticuerpos contra la cepa número 461 y para cerciorarnos de que no había anticuerpos contra los antígenos que se iban a utilizar.

Inmediatamente los conejos fueron inoculados, por vía intravenosa, con 1 c. c. de una suspensión de gérmenes muertos, en número de  $10^9$ , en solución salina fenicada al 0,5%, de la manera siguiente:

Conejo 101, suspensión de *E. coli*, tipo 0111.

Conejo 102, suspensión de *Shigella flexneri*, tipo 2<sup>a</sup>.

Conejo 103, suspensión de *Brucella abortus*, cepa 19.

\* Profesor Asociado de Microbiología, Facultad de Medicina, U. N.

\*\* Profesor de Microbiología, Escuela de Salud Pública, U. N.

Conejo 105, suspensión de una variedad hemolítica de *Proteus morgani*.

Conejo 106, suspensión de *Salmonella enteritidis*.

A los seis días de la administración de estos antígenos los conejos fueron sangrados, e inmediatamente después todos fueron inoculados por vía intramuscular, con 1 c. c. de una suspensión de la cepa número 461 de *Aeromonas sp.*, que contenía  $10^7$  gérmenes.

A partir de este momento, se realizaron sangrías a los dos, cuatro, siete y catorce días, y uno, dos, tres, cuatro y cinco meses. Las sangres se obtuvieron de la vena marginal y los sueros se mantuvieron en el congelador a  $20^{\circ}$  C. hasta el momento de practicar las reacciones simultáneamente.

#### Técnicas de demostración de anticuerpos.

1. Las técnicas para demostración de los anticuerpos, contra la cepa de *Aeromonas sp.*, ya han sido descritas en un artículo anterior e incluyen reacciones de aglutinación, fijación del complemento y de anti-hemólisis. (1).

2. Las técnicas para demostrar anticuerpos contra las cepas de *E. coli*, *P. morgani*, *Sb flexneri* y *S. enteritidis*, consistieron en la aglutinación, por el método en tubo, de estas suspensiones sometidas a  $55^{\circ}$  C. durante 30 minutos y conservadas en suero fisiológico fenicado al 0.5%, con una concentración de  $10^9$  gérmenes por c. c. Para el conejo 103, inoculado con la suspensión de *Br. abortus*, además de la técnica de aglutinación se empleó la técnica cuantitativa de fijación del complemento, para lo que el antígeno utilizado en la aglutinación se diluyó al 1/10; esta técnica no difería de la utilizada para la reacción

de fijación del complemento con la cepa número 461, sino, obviamente, por lo que respecta al antígeno.

Se hicieron diluciones dobles, progresivas, de los sueros procedentes de los diferentes conejos, iniciándolas al 1/20 y en volúmenes de 0.5 c. c., a los que se agregaban cantidades iguales de las respectivas suspensiones. La mezcla se dejó a  $37^{\circ}$  C., aproximadamente, durante 24 horas, y se procedió a la lectura de la aglutinación que, en sus grados menores, se llevó a cabo por medio de un aglutinoscopio.

#### Resultados.

##### 1. Respuesta primaria.

A los seis días de haber inyectado las suspensiones por vía intravenosa, se pudieron obtener los niveles más elevados de anticuerpos para los antígenos de *Brucella*, *Shigella* y *Proteus*. Con las suspensiones de *Salmonella enteritidis* y *E. coli* no se alcanzaron, sino hasta los días noveno y undécimo, respectivamente.

Estos títulos, que oscilan entre 1/5.120 para el conejo inmunizado con *S. enteritidis* y 1/1.280 para los otros conejos, se mantuvieron entre once y catorce días, para comenzar a declinar rápidamente al principio y a un ritmo más lento, en períodos posteriores (gráfico número 1).

A los cinco meses de haber practicado la inyección de estos antígenos los títulos observados fueron bajos, variando entre 1/40 para la *Brucella*; 1/80 para *Proteus*, *Coli* y *Shigella*; ostentando el título más elevado, el conejo inmunizado con la suspensión de *S. enteritidis*, que todavía aglutinaba a un título de 1/160.

##### 2. Respuesta secundaria.

En el momento de la sangría de control, es decir, después de haber sufrido tres dosis infectantes de *Aero-*

*monas sp.*, seguidas de un descanso aproximado de cinco meses a partir de la última, los títulos de anticuerpos contra la cepa número 461 variaban en los distintos conejos para las diferentes funciones anticuerpo que se querían demostrar (gráfico número 2). Los títulos más bajos se observaron por medio de la reacción de antihemólisis, que dio niveles entre 1/20 y 1/80. En cambio, las reacciones de aglutinación y fijación del complemento mostraban títulos que oscilaban entre 1/320 y 1/640.

La inyección intravenosa de las suspensiones de *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Brucella abortus*, *Proteus morganii* y *Salmonella enteritidis*, no afectó el nivel de estos anticuerpos.

La administración intramuscular de  $10^7$  microorganismos de la cepa número 461 de *Aeromonas sp.*, realizada a los seis días de haber inyectado los antígenos anteriores, produjo una elevación de los anticuerpos para la cepa en estudio que se evidenció, para uno de los conejos, entre el segundo y cuarto días, y, para todos los demás, entre el cuarto y séptimo días.

Las elevaciones en los títulos de los anticuerpos que se produjeron como respuesta a una nueva infección, variaron para los distintos animales, siendo los niveles mayores de 1/2.560.

Los títulos se mantuvieron inalterables durante periodos que oscilaban entre siete y setenta y seis días, y, cuando comenzaron a declinar, fue en forma muy paulatina.

Al darse por terminada la experiencia, los títulos demostrables por las reacciones de aglutinación y fijación del complemento, variaban entre 1/320 y 1/1.280 (gráfico número 3).

Mientras existía un marcado paralelismo en la función anticuerpo, puesta de manifiesto por medio de las reacciones de aglutinación y fijación del complemento, había una discrepancia por lo que hace a la inhibición

de la hemólisis. Después del discreto aumento experimentado a continuación de la primera inyección infectante, los títulos de antihemolisina permanecieron inalterables durante todo el proceso inmunitario.

#### Discusión.

Las primeras observaciones sobre elevación de anticuerpos tras la administración de sustancias no relacionadas antigénicamente con ellos datan de comienzos de este siglo. Dieudonne (2) fue el primero en comunicar el incremento de anticuerpos experimentado por conejos inmunizados contra el bacilo tífico a continuación de la inyección de cinamato sódico. Dreyer y Walker (3) obtuvieron un aumento de las aglutininas en conejos inmunizados con *E. coli* después de la inyección de *Staph aureus*. Weil y Félix (4) observaron un aumento de las aglutininas contra el bacilo tífico en el 53% de los pacientes con tifus exantemático y otros procesos infecciosos. A la misma conclusión llegó Fleckseider (5). Conradi y Bieling (6) observaron una elevación semejante de los anticuerpos contra el bacilo tífico en individuos inmunizados contra este microorganismo; estos autores lograron demostrar el mismo fenómeno en conejos inmunizados con bacilos tíficos después de la administración de microorganismos como colibacilo, diftérico, etc. Kirstein (7) obtuvo resultados análogos en conejos inmunizados con bacilos tíficos a los que se les administró virus de la vacuna.

Walbum y Berthelsen (8) observaron que la administración de determinadas sales conduce a un aumento en la producción de anticuerpos, presentándose una elevación secundaria si la inyección se realiza en el momento en que éstos comienzan a declinar.

Rosher (9), empleando conejos inmunizados con un antígeno de *Bacte. coli*, no logró demostrar una elevación secundaria de anticuerpos con inyección de *Staph. aureus* y eritrocitos de carnero. Dixon y Maurer (10) llegan a la misma conclusión utilizando como antígenos una serie de proteínas, sin observar nunca un aumento de anticuerpos a un antígeno tras la inyección de antígenos no semejantes. Clínicamente, Koomen y Morgan (11), en el curso de procesos febriles tan varios como influenza, pleuresía, bronconeumonía, mononucleosis, etc., estudian la respuesta serológica en individuos inmunizados contra el bacilo de la tifoidea, sin haber observado una elevación significativa de los anticuerpos.

En nuestras experiencias, la inyección intravenosa de suspensiones de *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Brucella abortus*, *Proteus morganii*, *Salmonella enteritidis*, que poseen una estructura diferente a la que presentan los gérmenes del género *Aeromonas*, no fue seguida de efecto alguno sobre los anticuerpos contra estos gérmenes.

La inoculación de la suspensión de *Aeromonas sp.*, número 461, va seguida de un notable aumento de los anticuerpos séricos demostrables por las técnicas de aglutinación y fijación del complemento. Este incremento tiene lugar entre los días 4 y 7, y tan sólo en uno de los animales la respuesta es más precoz, presentándose entre los días 2 y 4. Esta elevación guarda una relación con la respuesta primaria que oscila entre 8/1 y 32/1, para las reacciones de aglutinación y de fijación del complemento, mientras que la relación entre respuesta secundaria y primaria en la reacción de antihemólisis es de 1. Esta discrepancia de resultados vuelve a plantear las cuestiones que comunicábamos en un artículo previo (1). Parece interesante anotar el hecho de que la cantidad de

gérmenes de la cepa en estudio,  $10^7$ , utilizada para la reinfección última, no produjo en ninguno de los conejos alteraciones locales, mientras que las primeras inoculaciones habían provocado abscesos en las extremidades posteriores que se abrieron, y, espontáneamente, curaron. El hecho de no producirse cambios en el lugar de la inyección, indica claramente que los conejos presentan una inmunidad que persiste durante un período de tiempo largo, frente a una dosis provocadora intensa. La no elevación de anticuerpos a la hemolisina parece descartar el que pueda aceptarse esta substancia como factor de virulencia de los gérmenes que nos ocupan. En efecto, es bien conocido el hecho del incremento que experimentan los anticuerpos contra toxinas tras la administración del antígeno homólogo, aun cuando los niveles en el momento de la inyección sean muy bajos (12-13). En presencia de estos hechos es necesario concluir que la técnica de demostración de anticuerpos contra la hemolisina no es adecuada para evidenciar el estado de resistencia frente a los microorganismos de este género.

La persistencia de niveles elevados de anticuerpos (1/320 y 1/640), demostrables por las técnicas de aglutinación y fijación del complemento, en períodos muy tardíos del proceso inmunitario, es un hecho constante. Por medio de estas técnicas, cabe esperar poner de manifiesto infecciones antiguas en el hombre o los animales. Desafortunadamente, la complejidad antigénica de los microorganismos que constituyen este género (22), hace necesario el uso de diferentes suspensiones de gérmenes que representen a los varios grupos que lo integran, ya que el antígeno común a todos ellos, la hemolisina, no induce en el proceso infeccioso anticuerpos a niveles que sirvan para diagnóstico.

La persistencia de los niveles de anticuerpos depende de factores tan varios como el ritmo de introducción del antígeno (14, 15, 16), la dosis (17--18), el estado inmunitario previo (10, 19, 20, 21), el animal empleado, etc. En el caso de nuestras experiencias, es

necesario, además, tener en cuenta el haber utilizado una suspensión de gérmenes vivos con la posibilidad de que los animales puedan seguir albergándolos, y actuando de esta manera como un estímulo antigénico prolongado.

## RESUMEN

1. En la infección experimental de conejos con gérmenes del género *Aeromonas*, los anticuerpos demostrables por las técnicas de aglutinación y fijación del complemento persisten por un período de varios meses.
2. La introducción de antígenos, no emparentados con estos anticuerpos, no los afecta en sus niveles.
3. La reinfección experimental induce una respuesta inmunológica secundaria que se evidencia entre el cuarto y séptimo días.
4. Los niveles de antihemolisina no sufren modificación alguna tras la inyección de antígenos homólogos o heterólogos.
5. La persistencia de los anticuerpos durante la infección experimental sugiere que podrían buscarse en sueros humanos y de animales con fines epidemiológicos.

## SUMMARY

1. In experimental rabbit infections by germs of the genus *Aeromonas* using agglutination and complement fixation techniques antibodies formation persist for a period of several months.
2. The introduction of antigens unrelated to these antibodies do not affect their levels.
3. The experimental reinfection induces an immunological secondary response which is manifested between the fourth and seventh days.
4. The levels of antihemolysin do not undergo any modification after the injection of homologous or heterologous antigens.
5. The persistence of antibodies during the experimental infection suggests that they could be investigated for epidemic purposes in human and animals sera.

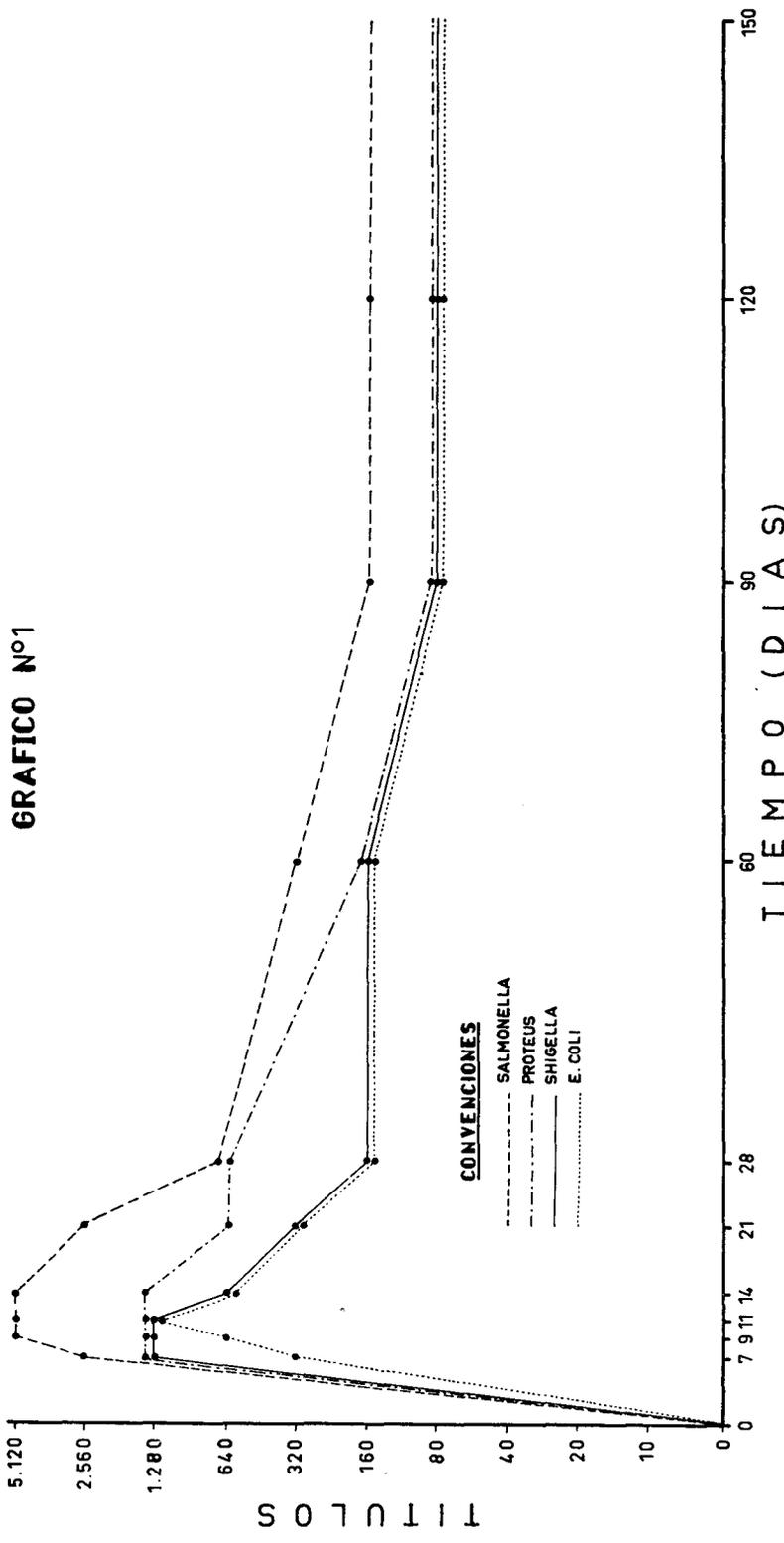
Damos las gracias a la señorita Nelly Rodríguez por su asistencia técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. MARTÍNEZ-SILVA, R., & SORIANO-LLE-RAS, A.: Rev. Fac. Med. Bogotá, 28: 115, 1960.
2. DIEUDONNE, A.: Med. Klin., 2: 575, 1906.
3. DREYER, G., & WALKER, E. W. A.: J. Path. Bact., 14: 28, 1909.
4. WEIL, E., & FÉLIX, A.: Wien. Klin. Wchschr., 29: 974, 1916.
5. FLECKSEDER, R.: Wien. Klin. Wchschr., 29: 637, 1916.
6. CONRADI, H., & BIELING, R.: Deutsche Med. Wchschr., 42: 1280, 1916.
7. KIRSTEIN, F.: Deutsche Med. Wchschr., 43: 325, 1917.
8. WALBUM, L. E., & BERTHELSEN, K.: Z. Immunforsch., 42: 467, 1925.

9. ROSHER, A. B.: *Lancet*, 2: 110, 1924.
10. DIXON, F. J., & MAURER, P. H.: *J. Immunol.*, 74: 418, 1955.
11. KOOMEN, J. (Jr.); & MORGAN, H. R.: *Am. J. M. Sc.*, 288: 520, 1954.
12. GLENNY, A. T., & SUEDEMERSEN, H. J.: *J. Hyg.*, 20: 176, 1921.
13. JONES, F. G., & MOSS, J. M.: *J. Immunol.*, 33: 173, 1937.
14. GOLDBERG, S. J.: *Zbl. Bakt.*, 30: 605, 1901.
15. BURNET, F.: *Monographs Walter and Eliza Hall Institute*, N° 1, 1941 (Australia).
16. SCHUETZE, H.: *J. Path. Bact.*, 53: 443, 1941.
17. EDSALL, G.; BANTON, H. J.; & WHEELER, R. E.: *Am. J. Hyg.*, 53: 283, 1951.
18. STEVENS, K. M.: *J. Immunol.*, 76: 187, 1956.
19. BARR, M., & LEWELLYN-JONES, M.: *Brit. J. Exp. Path.*, 32: 231, 1951.
20. MURRAY, E. S.; OFSTROCK, A.; & SNYDER, J. C.: *J. Immunol.*, 68: 207, 1952.
21. DIXON, F. J.; MAURER, P. H.; & DEICHMILLER, M. P.: *J. Immunol.*, 72: 179, 1954.
22. CASELITZ, F. H., & SCHÖNN, O.: *Zschr. Tropenmed. Parasit.*, 7: 350, 1956.

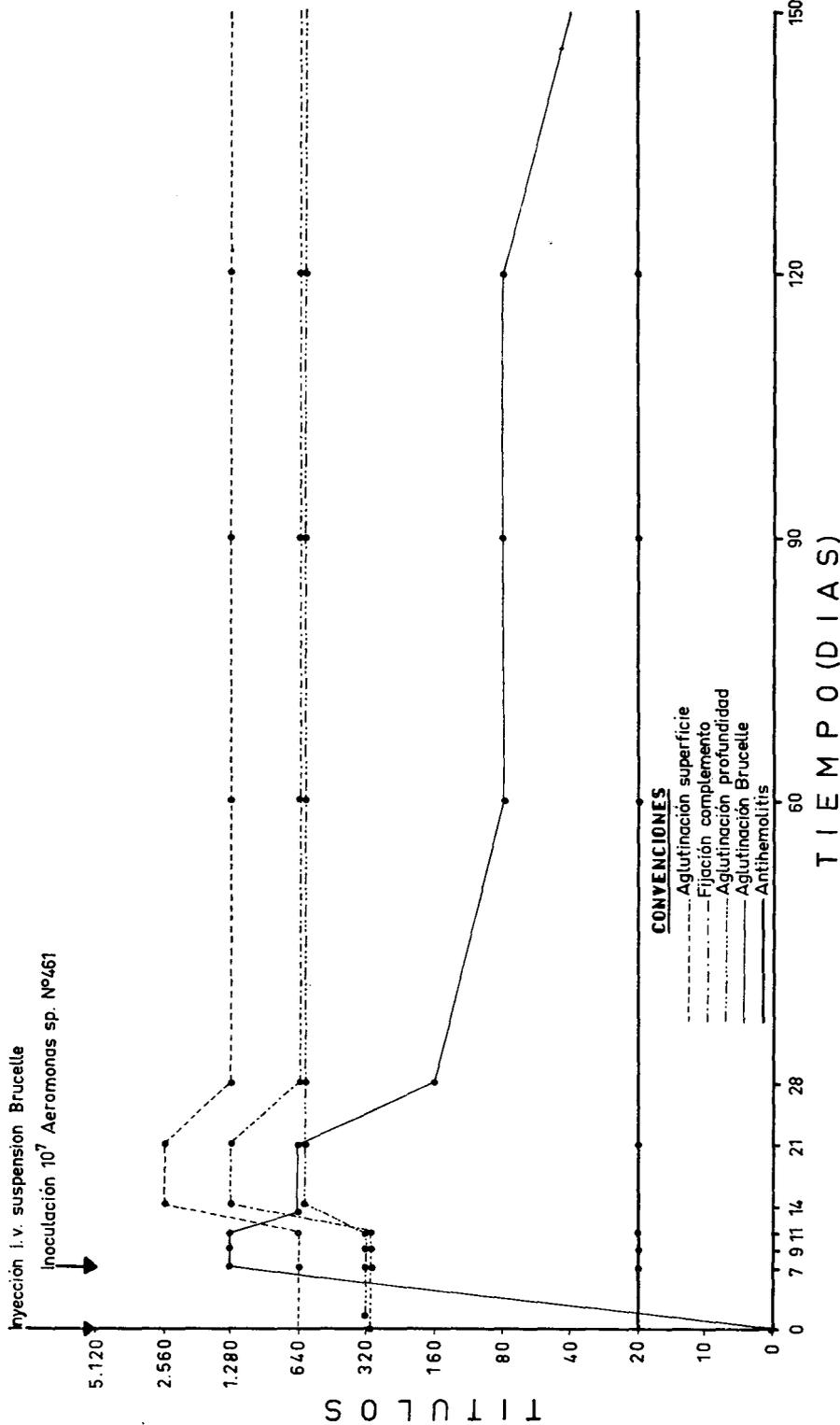
GRAFICO N°1



Respuesta inmunológica primaria a la introducción i. v. de antígenos en conejos infectados con aeromonas sp.

OBS.

# GRAFICO Nº2



Comparación de la respuesta primaria a la inyección de Brucelle abortus y secundaria a aeromonas sp. en el conejo 103.

OBS.

