

Respuesta Inmunológica en Conejos a la Infección Experimental con Gérmenes del Género *Aeromonas*

Por

RAMIRO MARTINEZ SILVA (*)

y

ANDRES SORIANO LLERAS (**)

En algunas de las infecciones naturales por gérmenes del género *Aeromonas*, ha sido posible demostrar la presencia de anticuerpos por medio de las reacciones de aglutinación y de inhibición de la hemólisis (1,2).

Como aportación al conocimiento de la inmunidad en infecciones causadas por gérmenes de este grupo, nos ha parecido interesante el estudio de la presencia de anticuerpos, momento de su aparición, títulos alcanzados y evolución durante el proceso infeccioso experimental por medio de las reacciones de aglutinación, fijación del complemento y antihemólisis.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron conejos adultos de pesos entre 2.500 y 3.000 gramos. Para infectarlos se utilizó la cepa N° 461, de *Vibrio jamaicensis*, aislada de intestino en un proceso diarreico; se cultivó en agar ordinario a 37° C., durante un período de 18 horas y los gérmenes se suspendieron en solución salina fisiológica. El número de microorganismos inoculados, por vía intramuscular, en el muslo, fue de 5 x 10⁻⁴, 10⁻⁵, 3 x 10⁻⁵, en los días 1, 7 y 23 de la experiencia.

Los conejos se sangraron a intervalos regulares, de la vena marginal de la oreja o por punción cardiaca, obteniéndose siempre el suero estérilmente. Las muestras se almacenaron en el congelador a 20° C., hasta el

día en que se practicaron las reacciones.

El contenido en anticuerpos de las diferentes muestras de sueros fue estudiado por medio de los siguientes métodos:

1) — AGLUTINACION

Se hicieron diluciones dobles progresivas de las muestras en suero fisiológico iniciándolas al 1|10, en volúmenes de 0.5 c.c., a las que se adicionaron cantidades iguales del antígeno.

El antígeno se obtuvo por cultivo, durante 18 horas a 37° C., de la cepa 461 en frascos de Roux que contenían agar ordinario a un pH de 7.4. Las colonias desarrolladas se suspendieron en suero fisiológico fenicado al 0.5%. Esta suspensión se lavó centrifugándola a 3.500 r. p. m., durante 30 minutos, retirando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en suero fisiológico fenicado al 0.5%. Este producto se dividió en dos fracciones:

FRACCION A:— Se le adicionó suero fisiológico fenicado para darle una concentración final de 10⁻⁹ gérmenes por c.c. Para cerciorarnos de que la suspensión no estaba en fase rugosa y evitar así falsas reacciones positivas, se procedió a practicar la reacción de la acriflavina, consistente en añadir a 0.9 c.c., de la suspensión de gérmenes 0.1 c.c., de una solución de acriflavina al 1|1000 y dejar actuar dos horas a temperatura ambiente; al cabo de este tiempo se hizo la lectura con ayuda del aglutinoscopio; en caso

(*) Profesor de Microbiología de la Escuela de Salud Pública.

(**) Profesor Agregado de Bacteriología de la Facultad de Medicina.

RESULTADOS:

1) — MOMENTO DE APARICION DE LOS ANTICUERPOS.

A los cinco días de la primera inculación fue posible demostrar anticuerpos con función fijadora del complemento, aglutinante y antihemolítica.

Los anticuerpos con función fijadora del complemento presentaban títulos de 1|160 (conejos 101, 104 y 106), títulos de 1|40 (conejos 102 y 103) y 1|10 (conejo 105) (Ver gráficos 1 y 2).

Los anticuerpos responsables de la aglutinación de superficie hacen su aparición a un ritmo muy semejante, encontrándose títulos análogos a los de la fijación del completo en tres casos (conejos 101, 102 y 106); el título es inferior al de la fijación del complemento en el conejo 104. (Relación 40|160) y 105, (relación 0|10); únicamente en uno de los conejos (103) el título de aglutinación supera al de fijación

del complemento (80|40) en esta fase inicial (Gráfico N° 1).

Los anticuerpos contra los antígenos de profundidad ostentan títulos inferiores a los de los anticuerpos contra los antígenos de superficie. Los títulos oscilan de negativo (conejo 105) hasta una dilución del 1|160 (conejo 106). La relación entre títulos de aglutinación de superficie y de profundidad el quinto día de la infección es 160|160, 40|20, 80|40, 40|20, 0|0 y 160|160. (Gráfico N° 3).

Los anticuerpos neutralizadores de la acción hemolítica de los filtrados alcanzan niveles bajos. Los títulos observados en el gráfico N° 4 representan diluciones del suero que varían de 1|10 a 1|80, capaces de inhibir la acción de 4 unidades hemolíticas. En tres de los conejos la inhibición de la hemólisis era evidente en el suero obtenido antes de iniciar el proceso inmunitario (1|10 a 1|40). Algunos sufrieron una elevación de los anticuerpos pero en el caso del conejo 104 el

GRAFICO N° 1

Relación entre fijación del complemento y aglutinación de superficie

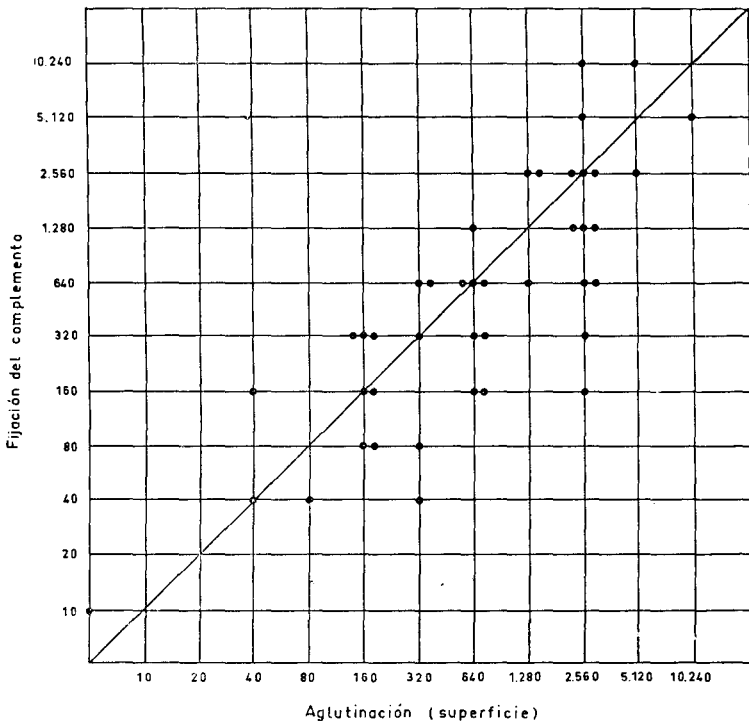
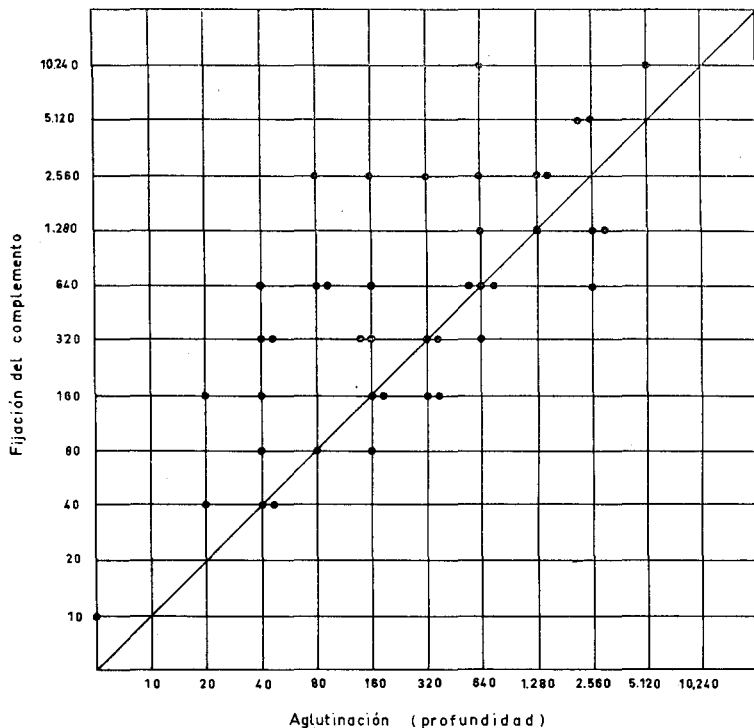


GRAFICO Nº 2

Relación entre fijación del complemento y aglutinación profunda



título encontrado antes de iniciar la infección (1/40) persistió inalterable durante los 70 días de la experiencia.

2)— TITULO.

Los niveles alcanzados por los anticuerpos en el suero varían en los distintos conejos, que responden de distinta manera a los estímulos antigénicos representados por las tres dosis. Después de la primera inoculación los títulos observados son discretos (gráfico Nº 4); ninguna de las funciones anticuerpo es demostrable en diluciones del suero superiores a 1/160; en algunos, sin embargo no es posible evidenciar anticuerpos aun a diluciones del 1/10 (conejo 105) por medio de las reacciones de aglutinación de superficie y de profundidad, pero encontrándose títulos de fijación del complemento del 1/10 y de antihemólisis al 1/20.

Tras una segunda inoculación el nivel de los anticuerpos se eleva hasta

alcanzar un título considerable 9 días más tarde, sobre todo en lo que se refiere a los anticuerpos demostrables por medio de la fijación del complemento y por las técnicas de aglutinación. El título mayor es alcanzado entre los 9 y los 34 días, después de la tercera dosis infectante, disminuyendo posteriormente de una manera gradual. Esta disminución hace llegar el título a un nivel semejante al observado tras la segunda dosis.

Por lo que respecta a la reacción de antihemolisina después de un ligero ascenso, tras la primera inyección, los títulos observados se mantienen muy estables.

A los 70 días de haber iniciado, la serie de tres inoculaciones y a los 45 de la última dosis los títulos más elevados los presentan los anticuerpos aglutinantes con diluciones del 1/2560, mientras que los títulos inferiores corresponden a los anticuerpos con función antihemolítica.

3)— PERSISTENCIA.

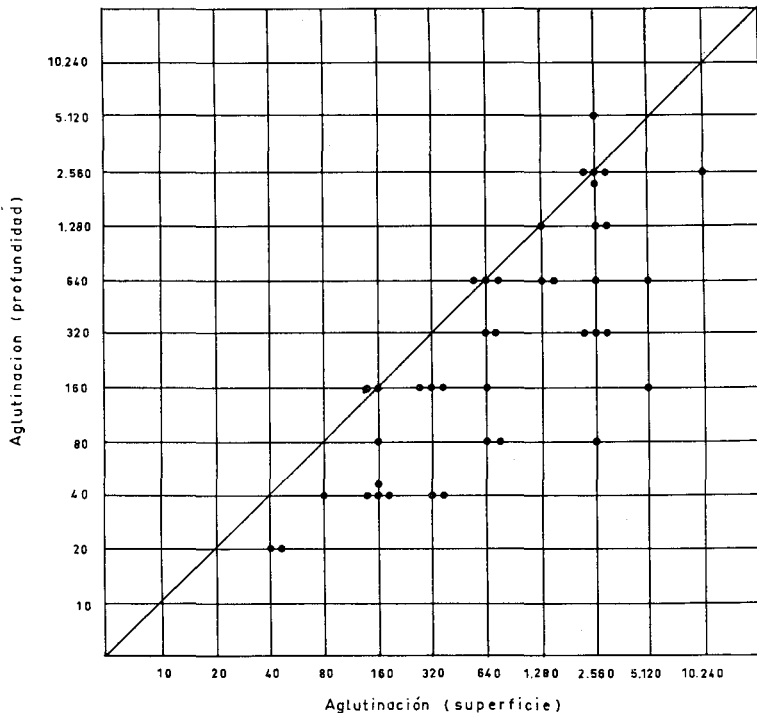
En general los anticuerpos, cuya aparición es evidente a los cinco días de la primera inoculación, siguen elevándose de manera progresiva. La única excepción la constituyó el conejo 106, que a los 10 días de la segunda dosis mostró un descenso del nivel de todos los anticuerpos. El título alcanzado no es muy alto pero después de la tercera inoculación hay un incremento muy notable hasta llegar a un maximum a los 34 días para dis-

persistiendo a los 70 días con niveles muy semejantes a los que ostentan en el momento culminante; el título mayor de aglutinación de profundidad lo presentó el suero del conejo 106 a los 34 días de iniciada la infección; este título que llegó a 1|5120 a los 70 días se mantenía al 1|2560.

4)— PARALELISMO

Las diferentes reacciones utilizadas para la demostración de los anticuerpos señalan una marcha paralela tan-

GRAFICO Nº 3
Relación entre aglutinación de profundidad y de superficie



minuir después; así la fijación del complemento, que tuvo un título de 1|10240, descendió hasta niveles de 1|160 (conejo 104) a los 70 días de iniciada la inoculación. La aglutinación de superficie no presenta niveles tan elevados pero su disminución no es tan marcada; así los niveles máximos son de 1|2560, descendiendo a 1|640.

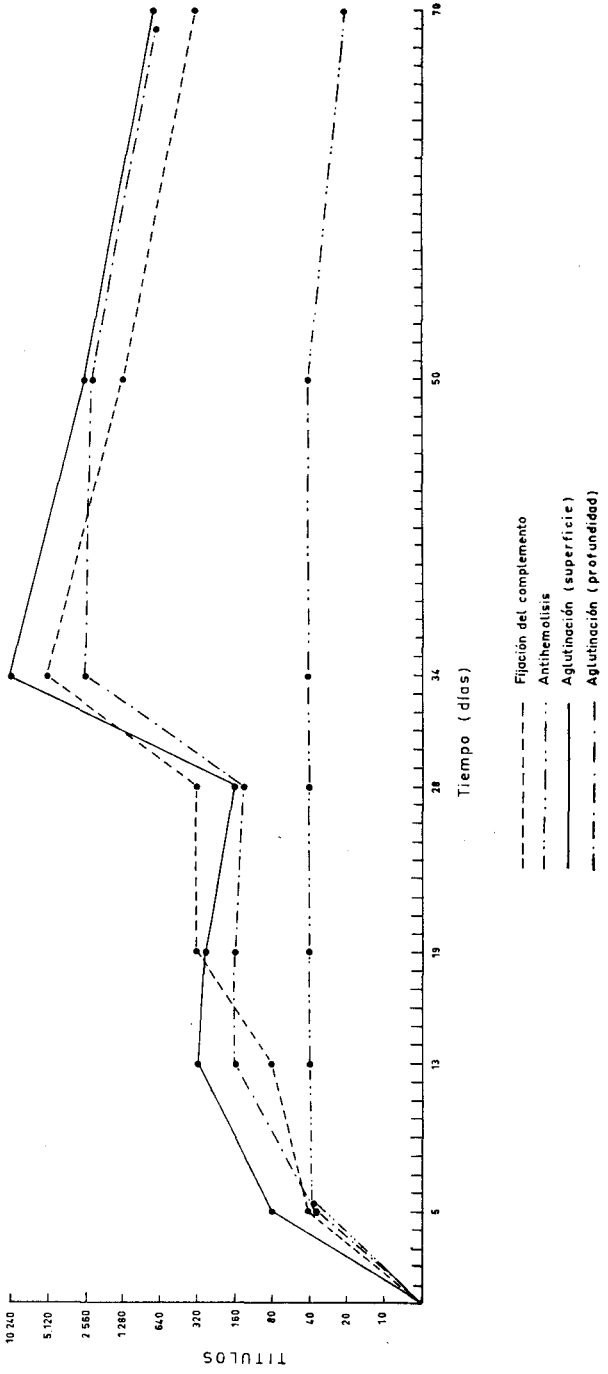
Los anticuerpos responsables de la aglutinación de profundidad presentan títulos elevados en períodos tardíos y desaparecen muy lentamente

en su aparición como en los niveles alcanzados en los períodos iniciales de la infección. (Gráficos I, II y III). No sucede lo mismo en lo que respecta a la fase tardía ya que a los 70 días los anticuerpos fijadores del complemento han disminuído notablemente mientras que los responsables de la aglutinación (superficie y profundidad), todavía presentan títulos elevados. En el gráfico Nº III se observa una desviación del título a favor de los anticuerpos responsables de la aglutinación de superficie en rela-

GRAFICO N° 4

Conejo 103

5×10^4 i.m. 10^5 i.m. 3×10^5 i.m.



ción con los de profundidad; esta desviación se hace menos marcada para alcanzar títulos iguales o superiores a medida que avanza el proceso inmunitario.

Es muy manifiesta la diferente curva que siguen los anticuerpos neutralizadores de la hemolisina; los títulos siempre son bajos y apenas son afectados por las inoculaciones sucesivas, permaneciendo en general inalterables durante todo el proceso inmunitario.

DISCUSION

En las distintas enfermedades infecciosas la aparición de anticuerpos demostrables por diferentes reacciones no es simultánea; los períodos en que es posible ponerlos de manifiesto son variables; cuantitativa y cualitativamente se comportan de manera distinta según la fase inmunitaria en que se obtienen.

De estos hechos se derivan consecuencias prácticas que determinan el uso de diferentes reacciones antígeno-anticuerpo en las distintas épocas del proceso infeccioso. Por ejemplo en el caso de la fiebre tifoidea la aparición más precoz de anticuerpos aglutinantes dirigidos contra antígenos somáticos es de valor diagnóstico comparado con la presencia más tardía y prolongada de los anticuerpos dirigidos contra los antígenos flagelares; en esta misma enfermedad la existencia de anticuerpos que reaccionan con el antígeno somático de superficie (antígeno Vi) frecuentemente traduce la presencia del agente etiológico en individuos que han pasado la enfermedad y se han convertido en portadores (5,6,7,8).

Otro caso de enfermedad bacteriana en que las reacciones antígeno-anticuerpo siguen curso distinto lo constituye la brucelosis. En esta infección pueden encontrarse dos síndromes serológicos que corresponden a una fase precoz y a una tardía (9, 10, 11); en la primera se encuentra habitualmente un título elevado de anticuerpos con función aglutinante, un título semejante o ligeramente superior de anticuerpos incompletos demostrables por la técnica de Coombs y un título bajo de anticuerpos fijadores del complemento; en la segunda fase cuyo límite puede establecerse a los seis meses de iniciado el proceso, los títulos de aglutinación suelen ser bajos y los de fijación del complemento elevados coincidiendo con niveles altos de anticuerpos incompletos.

En nuestras experiencias la aparición de anticuerpos demostrables por

las cuatro reacciones estudiadas es un hecho constante a los pocos días de la primera inyección de gérmenes. El nivel alcanzado por medio de las diferentes reacciones es variable en la primera determinación; en los días sucesivos puede apreciarse un paralelismo especialmente notorio en lo que se refiere a pruebas de aglutinación y fijación del complemento; sin embargo los títulos alcanzados por la reacción de aglutinación de profundidad siempre son inferiores a los que se obtienen con la aglutinación de superficie y con la fijación del complemento; pero a medida que avanza el proceso infeccioso los valores se aproximan hasta llegar a superar los títulos de aglutinación profunda a los de las otras dos reacciones.

En cambio la presencia de anticuerpos demostrables por medio de la reacción de antihemolisis, si bien alcanzan títulos similares a los demostrados por otras reacciones, al quinto día de la infección, no sufren variación en el curso del proceso infeccioso. Para explicar este hecho caben tres hipótesis:

- 1) La hemolisina producida por los gérmenes de este grupo es poco antigénica.
- 2) Esta hemolisina presentaría la propiedad de algunos enzimas de no ser neutralizados en su totalidad por los anticuerpos específicos.
- 3) La hemolisina una vez liberada por el germen es neutralizada por los anticuerpos que se encuentran en el torrente circulatorio formándose un complejo hemolisina-antihemolisina que sería antigénicamente inerte.

La primera hipótesis no parece aceptable; hay hemolisinas como la S de los estreptococos que está desprovista de carácter antigénico (12); pero en el caso de la hemolisina que nos ocupa es posible demostrar, a los cinco días anticuerpos con acción inhibidora sobre cuatro unidades hemolíticas en diluciones del suero iguales a los de las otras reacciones. Además es posible obtener un antisuero con un título elevado de unidades anti-hemolíticas por inmunización artificial (4).

Por la misma razón tampoco es satisfactoria la segunda hipótesis. Los anticuerpos dirigidos contra enzimas (13) si no inhiben su acción en períodos precoces de la inmunización sue-

len hacerlo en un porcentaje mayor a medida que progresa el proceso inmunitario. En el caso de los anticuerpos contra la hemolisina de los gérmenes del género *Aeromonas* se presenta una neutralización a título bajo pero completa en una fase muy precoz sin que haya un incremento posterior.

La tercera hipótesis parece aceptable por el hecho de que no se registra un aumento a pesar de las repetidas dosis infectantes. Esta neutralización tendría lugar en el foco inflamatorio, lo que impediría la difusión de la hemolisina y acción posterior sobre el aparato formador de anticuerpos. No sucedería lo mismo en el caso de una inmunización artificial en que al introducir por vía intra-venosa cantidades elevadas de la hemolisina se presentaría la posibilidad de inducir la aparición de anticuerpos.

En el caso de los gérmenes que integran el género *Aeromonas* su constitución antigénica es muy variable y heterogénea hasta el punto de diferir totalmente entre sí (14). Posiblemente los representantes patógenos de este grupo aislados del hombre y de los animales sean de la complejidad antigénica de la *Salmonella*. Pero en el grupo de gérmenes del género *Aeromonas* existe una fracción antigénica común a todos ellos: la hemolisina. Sería de un gran valor práctico de-

mostrar la presencia de títulos elevados de antihemolisina en el suero de los pacientes que facilitara el diagnóstico de la infección y permitiera conocer la epidemiología de estos gérmenes. Pero resulta arriesgado el dar valor definitivo a diluciones del suero del 1/40 ó 1/80 frente a 4 unidades hemolíticas cuando en ocasiones este mismo suero es capaz de fijar el complemento en presencia de su antígeno homólogo o causar la aglutinación de las suspensiones bacterianas en diluciones del 1/10 240. A este respecto consideramos interesante el conejo 104 en cuyo suero antes de iniciarse las inoculaciones infectantes no se pudieron evidenciar anticuerpos aglutinantes o fijadores del complemento, pero que presentaba una inhibición de la acción hemolítica de 4 unidades en diluciones del 1/40. Durante todo el proceso de inoculación el título de antihemolisina permaneció inalterado mientras que los anticuerpos demostrables por aglutinación o fijación del complemento presentaron elevaciones hasta del 1/10 240. Este caso hace pensar que el conejo haya sufrido una infección natural por un germen de este grupo cuya fórmula antigénica difiera de la presentada por la cepa 461, pero que produciendo la hemolisina que les es común haya formado anticuerpos contra ella, persistiendo posteriormente sin sufrir modificaciones tras las tres dosis infectantes.

RESUMEN:

1—La infección experimental de conejos con gérmenes del género *Aeromonas* induce la formación de anticuerpos contra antígenos superficiales, profundos y hemolisina.

2—Los niveles de los anticuerpos con función aglutinante y fijadora del complemento van ascendiendo de manera variable a partir del quinto día de la infección, para alcanzar títulos máximos a los 34 días.

3—La aparición y el descenso corren paralelamente en las reacciones de aglutinación superficial y fijación del complemento, persistiendo más los anticuerpos responsables de la aglutinación de profundidad.

4—Los anticuerpos con acción inhibidora de la hemolisina tras un ligero ascenso se mantienen inalterables en todo el curso de la infección.

SUMMARY:

1—Experimental infection of rabbits with bacteria of the genus *Aeromonas* induces specific antibodies for somatic antigens and hemolysin.

2°—With relation to the agglutination and complement fixation properties of antibodies their level begins to rise from the 5th day of infection reaching its maximum on the 34th day. This rate of increase is, however, variable.

3°—In both agglutination and complement fixation tests appearance and decrease of the antibodies level follow a similar pattern.

4°—Antibodies acting as hemolysin inhibitors maintain a stable level after a slight initial increase.

Damos las gracias a la señorita Nelly Rodríguez por la ayuda prestada en la elaboración de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. CASELIZ, F. H., HOFMANN, A. und MARTINEZ SILVA, R.: Unbeschriebener Keim der Familie Pseudomonadaceae als Infektionserreger.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 170 (1957)
2. MARTINEZ SILVA, R. y SORIANO LLERAS, A.: Estudios experimentales en seis cepas de *Vibrio jamaicensis*.
Rev. Fac. Med., Bogotá, 28, 61-69 (1960).
3. KOLMER, J. A., SPAULDING E. H. and ROBINSON, H| W.: *Approval Laboratory Technic*. Apleton Century Crofts, Inc. (1951).
4. MARTINEZ SILVA, R. und CASELITZ, F. H.: Die Antihämolysinbildung der Mikroorganismen vom Typ des *Vibrio jamaicensis*, ihre Bedeutung und Problematik.
Zschr. Tropenmed., 8, 349 (1957).
5. FELIX, A.: Detection of chronic typhoid carriers by agglutination tests.
Lancet, 2, 738-741 (1938).
6. ELIOT, C. P.: The Vi agglutination test as aid in detection of chronic typhoid carriers.
Am. J. Hyg., 31, 8-15 (1940).
7. ELIOT, C. P., and CAMERON, W. R.: Epidemiological investigation of rural typhoid with the aid of Vi agglutination test.
Am. J. Pub. Health, 31, 599-604 (1941).
8. KLEIN, M.: V antigen detection of typhoid carriers.
J. Infect. Dis. 72, 49-57 (1943).
9. FOZ, A.: Valor de la reacción de fijación del complemento en el diagnóstico de la brucelosis humana.
IV Congreso Inter. Hig. Med. Mediterraneo, 173-190 (1953).
10. FOZ, A. und ARCALIS, L.: Die Komplementbindungsreaktion in der Diagnose der menschlichen Brucellose.
Zschr. Hyg., 136, 55-66 (1953).
11. FOZ, A. et GARRIGA, S.: Relation entre la fixation du complément et les "anticorps incomplets" (test de Coombs) dans la brucellose humaine.
Rev. d'Immunol., 18, 288-298 (1954).
12. BERNHEIMER, A. W.: Streptolysins and their inhibitors.
Streptococcal Infections, New York, Columbia (1954).
13. CINADER, B.: Antibodies against enzymes.
Ann. Rev. Microbiol., 11, 371-390. (1957).
14. CASELITZ, F. H., und SCHONEN, O.: Serologische Studien an *Vibrio jamaicensis* und verwandten Vibrionensämmen.
Zschr. Tropenmed., 7, 350. (1956).