

ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN SEIS CEPAS DE *VIBRIO JAMAICENSIS*

Por

RAMIRO MARTÍNEZ SILVA *
ANDRÉS SORIANO LLERAS **

En 1953 fue aislado en Jamaica, a partir del material de autopsia de una mujer muerta con un cuadro de septicemia fulminante, un microorganismo al que se dio el nombre de *Vibrio Jamaicensis* (1). La inoculación en animales de experimentación, con reproducción de las lesiones encontradas en esa paciente, permitió comprobar que el germen aislado era el agente responsable del proceso (2).

En el curso de los siguientes años fueron aislados gérmenes, con características semejantes, a partir de material humano y de animales de sangre caliente (heces, orina, exudados), tanto en Jamaica como en otros países (3, 4, 5, 6). Los estudios realizados con ellos han permitido clasificarlos en la familia Pseudomonadaceae, género *Aeromonas* (7, 8).

Los representantes típicos de este género se conocían como productores de enfermedad en los animales de sangre fría (ascitis de las carpas), encon-

trándose ampliamente extendidos en el agua de ríos y lagos, pero no se les había prestado atención como agentes patógenos en el hombre (9).

Las comunicaciones sobre aislamiento de estos gérmenes, a partir de material humano, han ido sucediéndose cada vez con mayor frecuencia, y nosotros queremos aportar los datos acerca de las características de seis microorganismos aislados durante los estudios realizados en nuestro Departamento sobre etiología bacteriana de las diarreas infantiles.

Considerando que en 1.200 muestras intestinales estudiadas hasta el momento, hemos aislado seis cepas de este género, pensamos que su hallazgo dista mucho de ser un hecho excepcional. Creemos, además, que estos son los primeros casos comunicados en el país, y que sería interesante intensificar la búsqueda del germen para aclarar la importancia del problema en nuestro medio.

MATERIAL Y METODOS

El material estudiado procede de fuentes humanas, y, en todos los casos, las cepas han sido aisladas del intestino

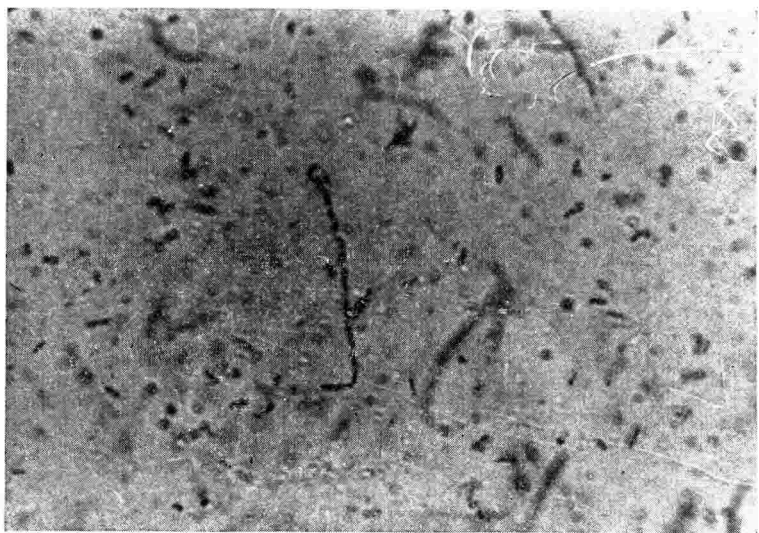
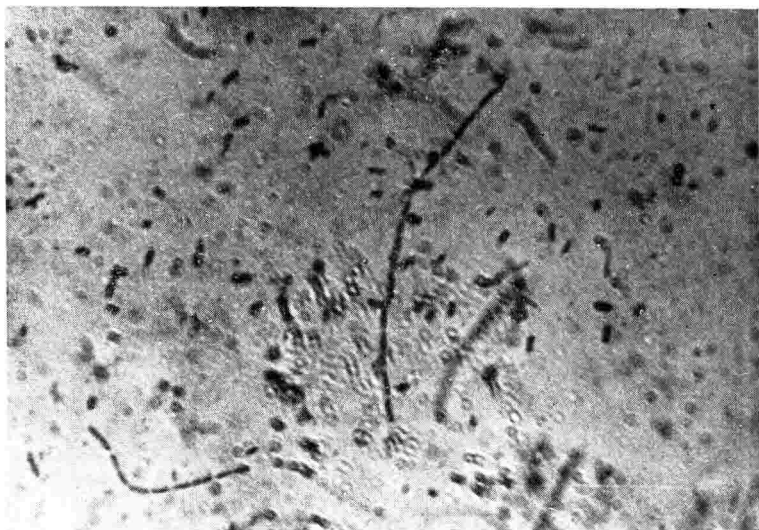
* Profesor de Microbiología de la Escuela de Salud Pública. Universidad Nacional.

** Profesor Agregado de Bacteriología de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional.

tomando las muestras por medio de un escobillón. En las placas de agar sangre las colonias presentan un halo de hemólisis beta muy pronunciada que las hace fácilmente reconocibles, a lo

que se añade su carácter de lactosa negativas en los medios usuales para el estudio de las Enterobacteriáceas.

Las cepas 52, 671, 1171 y 1268 proceden de niños, y la cepa 461, de un



adulto. Todos presentaban un cuadro intestinal grave, y en ninguno de ellos fue posible aislar otro germen que se pudiera responsabilizar del proceso. El germen 246 se aisló igualmente del intestino de un niño con un cuadro respiratorio y que había sido sometido a un tratamiento prolongado con antibióticos.

Morfología: Se trata de bacilos rectos, que pueden adoptar formas ligeramente curvadas, sobre todo en el ma-

terial patológico. Generalmente no sobrepasan las 3 micras de longitud. Pueden aparecer solos, en parejas, y, cuando los cultivos son viejos, no es raro encontrar formas filamentosas. Poseen uno o más flagelos que les prestan activa movilidad. No son esporulados. Se tiñen fácilmente por los colorantes ordinarios y son Gram negativos.

Bioquímica: Las propiedades bioquímicas de los gérmenes estudiados están expresadas en el cuadro siguiente:

CUADRO NUMERO 1

PROPIEDADES BIOQUIMICAS

	52	246	461	671	1171	1268
Glucosa	○	+	○	○	○	+
Manita	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	(11)	+	(7)	+	(6)
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	—	—	—	+	(2)	—
Dulcita	—	—	—	—	—	—
Inosita	—	—	—	—	—	—
Rhamnosa	—	—	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—	—	—
Adonita	—	—	—	—	—	—
Sorbita	—	—	—	—	—	—
Rojo Metilo	—	—	—	—	—	—
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	—	—	—
Indol	+	+	+	+	+	+
SH ₂	—	—	—	—	—	—
Gelatina	+	+	+	+	+	+
Urea	—	—	—	—	—	—
Nitratos	+	+	+	+	+	+
Lecitinasa	+	+	+	+	+	+

○ Producción de gas.

() Día de incubación a 37°C, en que se produjo viraje del indicador.

Los resultados obtenidos no son uniformes. Hay un desdoblamiento de la glucosa, manita, sacarosa y maltosa que se hace evidente en las primeras veinticuatro horas de incubación a 37° C.; algunas cepas no producen gas, como sucedió en las 246 y 1268, aun después de quince días de incubación. Ha resultado un carácter constante la fermentación tardía de la lactosa, en períodos que oscilaron entre cinco y once días. La arabinosa ha sido fermentada por el germen 1268 a las veinticuatro horas de incubación, y a las cuarenta y ocho horas por el 671; los demás no han tenido acción sobre ella.

La utilización del citrato no ha sido constante; de las seis cepas estudiadas, tan sólo tres, las 52, 246 y 461, han crecido en el medio de Simmons.

Nos parece interesante hacer constar el hecho de la formación de un halo de precipitado en torno a las colonias desarrolladas en los medios sólidos a base de yema de huevo. Ese halo traduce la formación de lecitinasa, y varía para las distintas cepas, desde un diámetro de 1 mm., como la cepa 671, hasta uno de 3 mm., como la 461.

Toxina: La sustancia responsable de la zona de hemólisis beta que rodea a las colonias se comporta como una exotoxina, y, posiblemente, es idéntica a la causante de la muerte de los animales de experimentación inoculados con los filtrados de los cultivos (10, 11).

Para estudiar la acción tóxica de los cultivos y de sus filtrados fueron inoculados tres grupos de ratones por vía intravenosa, con la cepa 52.

Grupo 1: Se inoculó un cultivo de cuarenta y ocho horas en agua de peptona al 2%, con un pH de 7.4, con una concentración de 10^9 gérmenes por c. c.. El inóculo fue de 0.1 c. c. del cultivo puro y de diluciones al 1/10, 1/100 y 1/1.000.

Grupo 2: Fue inoculado el mismo cultivo anterior, pero sometido a la temperatura de ebullición durante sesenta minutos, y en las mismas diluciones.

Grupo 3: La inoculación se hizo con cultivo de cuarenta y ocho horas, filtrado a través de una bujía Chamberlan L₂, y en las mismas diluciones que los anteriores.

Los resultados obtenidos en estos tres grupos están resumidos en el cuadro siguiente:

CUADRO NUMERO 2

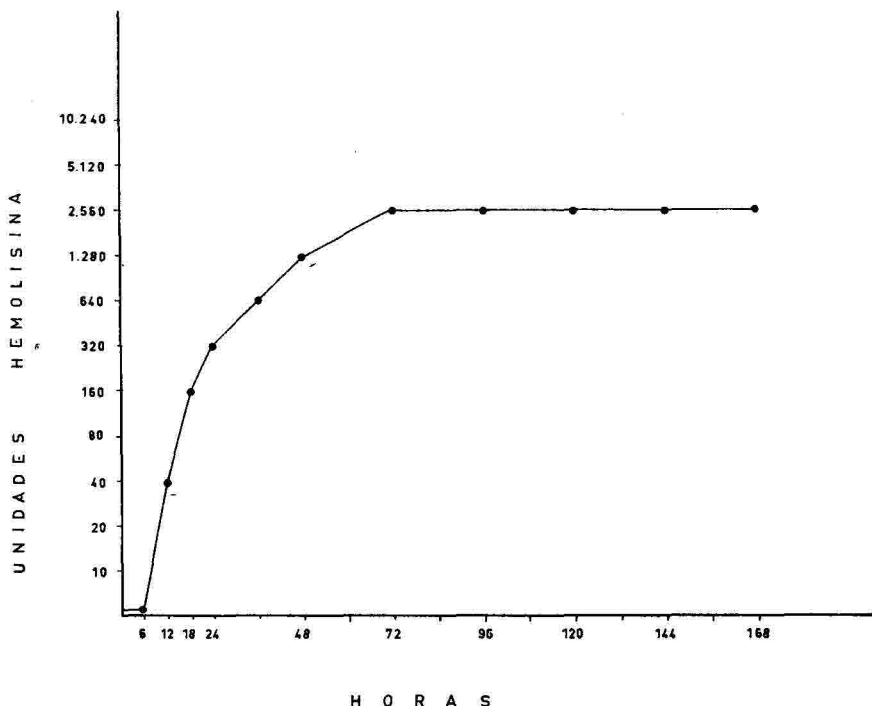
PRUEBAS DE TOXICIDAD (GERMEN 52)

Producto	Volumen	Dilución	Número de gérmenes	Resultados a las 48 horas
Cultivo a las 48 horas . . .	0'1	—	10^8	5/5
	0'1	1/10	10^7	5/5
	0'1	1/100	10^6	1/5
	0'1	1/1.000	10^5	0/5
Cultivo 48 horas (ca-lentado) .	0'1	—	10^8	0/5
	0'1	1/10	10^7	0/5
	0'1	1/100	10^6	0/5
	0'1	1/1.000	10^5	0/5
Filtrado .	0'1	—	—	2/5
	0'1	1/10	—	1/5
	0'1	1/100	—	0/5
	0'1	1/1.000	—	0/5

Del cuadro anterior se deduce que la acción letal sobre los ratones se debe a una sustancia extracelular, posiblemente una exotoxina, que quizá sea la misma que tiene propiedades hemolíticas. Esta sustancia se seguiría elaborando por los gérmenes vivos inocu-

GRAFICO Nº1

CURVA PRODUCCION HEMOLISINA CEPA 52



lados en el organismo animal, lo que explicaría la mayor letalidad del cultivo que del filtrado. El filtrado utilizado en esta experiencia tenía un contenido de 160 unidades hemolíticas por c. c., cifra baja que explica la escasa letalidad en el experimento actual.

La capacidad hemolítica de los filtrados fue estudiada en las seis cepas. Los gérmenes fueron cultivados en

agua de peptona al 2% con un pH 7.4, incubados a una temperatura de 37°. A intervalos variables se tomó el cultivo y se filtró a través de una bujía Chamberland L₂ o Berkefeld W. De los filtrados así obtenidos se hicieron diluciones dobles progresivas en solución salina fisiológica, en volúmenes de 0,5 c. c., iniciándolas al 1/5; a estas diluciones se les adicionó un volumen

igual de una suspensión de eritrocitos de conejo al 0.5 %. La mezcla filtrado-hematíes se llevó al baño maría a 37° y se dejó incubar durante cuarenta y cinco minutos. Al final de este tiempo se retiró y se dejó a temperatura de nevera por un espacio de dos horas. En estas condiciones se consideró como unidad hemolítica la dilución más elevada del filtrado, capaz de producir una hemólisis completa.

La producción de hemolisina en el cultivo puede iniciarse a las pocas horas de incubación, presentándose títulos apreciables entre las seis y las doce horas. El nivel de hemolisina alcanza un máximum entre las cuarenta y ocho y setenta y dos horas, manteniéndose constante por tiempos variables; en uno de los casos estudiados por nosotros, hasta treinta y un días.

El gráfico número 1 muestra la curva de producción de hemolisina de la

cepa 52 con titulaciones seriadas cada seis horas.

Antigenicidad: La estructura antigénica de los gérmenes de este grupo ha sido estudiada por Caselitz y Schoen (12), quienes concluyeron de sus trabajos la presencia de antígenos somáticos de profundidad y superficie.

Que las infecciones por estos gérmenes pueden originar anticuerpos contra las fracciones antigénicas somáticas, así como contra la hemolisina ha sido demostrado por Caselitz, Hoffmann y Martínez (4), en un paciente con un proceso osteomielítico causado por un microorganismo de este grupo.

Los títulos hemolíticos de los filtrados de los diferentes cultivos varían entre sí. A continuación exponemos los datos obtenidos con las seis cepas cultivadas en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo de veinticuatro horas de incubación.

CUADRO NUMERO 3

ACCION HEMOLITICA DE LOS FILTRADOS

		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	Control hematíes
Filtrado	52	H	H	H	H	H	±	O	O	O	O
	246	H	H	H	O.	O	O	O	O	O.	
	461	H	H	H.	H.	O	O	O	O	O	
	671	H	H.	O	O	O	O	O	O	O	
	1171	H	H	H.	O.	O	O	O	O	O	
	1268	H	H	±	O	O	O	O	O	O	

H == Hemólisis total.

H. == Hemólisis no completa.

± == Hemólisis parcial.

O. == Indicios de hemólisis.

O == No hemólisis.

Para la obtención de un suero anti-hemolisina hemos inmunizado un conejo con filtrado del germen 52. La inmunización se inició con filtrado tratado por formol al 0.4 % (anatoxina),

para continuar con filtrado puro; la primera dosis se aplicó por vía subcutánea, y las cuatro dosis siguientes por vía intravenosa, con intervalos de cinco días. El suero se obtuvo estérilmen-

te por punción cardíaca una semana después de la última dosis inmunizante.

De este suero se hicieron diluciones dobles progresivas en volúmenes de 0.5 que se pusieron en contacto con iguales volúmenes de los filtrados de los gérmenes, diluidos de tal manera que contuvieran exactamente 8 unidades hemolíticas por c. c. La mezcla suero y filtrado se incubó a 37° C. durante

cuarenta y cinco a sesenta minutos, y a continuación se añadió 0.1 c. c. de una suspensión de eritrocitos de conejo al 3%, para determinar si la hemolisina había sido neutralizada o si todavía estaba libre. El cuadro siguiente muestra los resultados obtenidos con este suero y las hemolisinas de las seis cepas.

CUADRO NUMERO 4

NEUTRALIZACION DE LOS FILTRADOS POR MEDIO DE SUERO DE CONEJO ANTIHEMOLISINA

Diluciones de Suero										Control Filtrados				Control
										4UH	2UH	1UH	½UH	hematíes
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280						
Filtrado	52	O	O	O	O	±	H	H	H	H	H	H	±	O
	246	O	O	O	O	±	H	H	H	H	H	H	±	
	461	O	O	O	O	H.	H	H	H	H	H	H	H.	
	671	O	O	O	±	H	H	H	H	H	H	H	H	
	1171	O	O	O	O	O.	H	H	H	H	H	H.	O	
	1268	O	O	O	O	±	H	H	H	H	H	H	±	

Es evidente que diluyendo los filtrados en forma tal que contengan un número igual de unidades hemolíticas en un mismo volumen, el suero neutraliza a los diferentes filtrados a la misma dilución. En este caso, como el suero diluido al 1/80 está frente a cuatro unidades hemolíticas, quiere decir que posee la capacidad de neutralizar una unidad hemolítica cuando se diluye al 1/320, lo que equivale a 320 unidades antihemolíticas por c. c.

Durante nuestros estudios hemos podido disponer de dos sueros de los pacientes de quienes se habían aislado microorganismos de este grupo; los sueros correspondientes a los pacientes

246 y 461. El cuadro número 5 muestra el nivel de antihemolisina presente en los dos diferentes sueros.

CUADRO NUMERO 5

ANTIHEMOLISINA EN LOS SUEROS 246 Y 461

	Suero 246		Suero 461	
Filtrado 52	40 U. A.		80 U. A.	
246	40 U. A.		80 U. A.	
461	80 U. A.		160 U. A.	
671	40 U. A.		80 U. A.	
1171	40 U. A.		80 U. A.	
1268	40 U. A.		80 U. A.	

Igualmente se ha estudiado en estos sueros la presencia de anticuerpos con función aglutinante. Como antígenos se han utilizado suspensiones de los gérmenes cultivados en agar nutritivo a 37° C durante 18 horas, y suspendidos en solución salina fisiológica fenicada al 0,5%. La concentración de los gérmenes era de mil millones por c. c. Esta suspensión se dividió en dos grupos: 1) suspensión utilizada tal como queda descrito; y 2) la suspensión se sometió a la temperatura de ebullición durante sesenta minutos, para destruir los antígenos termolábiles; una vez calentada, se centrifugó a 3.500 r. p. m. durante treinta minutos, y se retiró el

líquido sobrenadante para descartar los antígenos solubles en él; el sedimento fue resuspendido en suero fisiológico fenicado al 0,5%, dándole una concentración de gérmenes igual al de la suspensión original.

De los sueros de los enfermos se hicieron diluciones dobles progresivas, iniciándolas al 1/40, y se pusieron en contacto con volúmenes iguales de las suspensiones original y calentada de cada uno de los gérmenes. El suero 246 no mostró función aglutinante frente a las dos suspensiones de los seis gérmenes. Los resultados obtenidos con el suero 461 están representados en el siguiente cuadro:

CUADRO NUMERO 6

PROTOCOLO AGLUTINACION DEL SUERO 461

		Diluciones del suero						Control
		1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	
Suspensión	52	—	—	—	—	—	—	—
	246	—	—	—	—	—	—	—
	461	+	+	—	—	—	—	—
	671	++	—	—	—	—	—	—
	1171	—	—	—	—	—	—	—
	1268	—	—	—	—	—	—	—
Suspensión calentada	52	—	—	—	—	—	—	—
	246	++	+	±	—	—	—	—
	461	++	++	+	+	—	—	—
	671	+	+	—	—	—	—	—
	1171	—	—	—	—	—	—	—
	1268	—	—	—	—	—	—	—

Como puede verse, este suero dio títulos aglutinantes superiores en presencia de suspensiones calentadas, lo que habla a favor de un antígeno somático bloqueante de superficie. Los

resultados negativos con algunas cepas confirman las experiencias de Caselitz y Schoen acerca de la heterogeneidad antigénica de los microorganismos de este género.

RESUMEN

Se informa acerca del aislamiento de seis gérmenes del género *Aeromonas*, procedentes de material humano.

Se estudian las características bioquímicas y se ponen de manifiesto las diferencias con los representantes típicos del género.

Se estudia experimentalmente la acción de la toxina sobre ratones y la producción de hemolisina y su neutralización por un suero específico.

Se demuestra la presencia de anticuerpos en el suero de dos de los pacientes en los que se hizo el aislamiento del germen.

SUMMARY

The isolation of six germs of the *Pseudomonas* genus is reported. The variations from the typical representatives of the genus are mentioned and their biochemical characteristics examined. The toxin is used experimentally on mice and the production of hemolysin and its neutralization by a specific serum studied. The presence of antibodies in the serum of two of patients infected with the organisms is demonstrated.

Agradecemos su colaboración a las señoras Blanca Cárdenas y Nelly Rodríguez.

BIBLIOGRAFIA

- HILL, K. R.; CASELITZ, F. H., and MOODY, L. M.: "A Case of Acute, Metastatic Myositis Caused by a New Organism of the Family Pseudomonaceae". *West Ind. Med. J.*, 3: 9, 1954.
- CASELITZ, F. H.: "Ein Neues Bacterium der Gattung: *Vibrio Müller*". *Zschr. Tropenmed.*, 6: 52, 1955.
- CASELITZ, F. H.: "Biologische Studien an Bisher Unbeschriebenen *Vibrio*-nenstämmen". *Zschr. Tropenmed.*, 7: 341, 1956.
- CASELITZ, F. H.; HOFMANN, A., und MARTÍNEZ SILVA, R.: "Unbeschriebener Keim der Familie Pseudomonaceae als Infektionserreger". *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 170: EFD, 1957.
- KJEMS, E.: "Studies on Five Bacterial Strains of the Genus *Pseudomonas*". *Acta Path. Microb. Scand.*, 36: 531, 1956.
- BRAS, G.; CLEARINK, K. P.; ANNAMUNTHODO, H., and CASELITZ, F. H.: "Abdominal Actinomycosis Associated with Idiopathic Gangrene of Scrotum". *West Ind. Med. J.*, 3: 137, 1954.
- CASELITZ, F. H.: "Grundsätzliche Erwägungen über den *Vibrio Jamaicensis*. (Vorkommen, Klassifizierung, Verwandtschaft)". *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 173: 238, 1958.
- CASELITZ, F. H., und BUCK, A. A.: "Biologische Studien an Mikroorganismen des Genus *Aeromonas*". *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 173: 407, 1958.
- SCHAEFERCLAUS, W.: "Beitrag zur Entstehung der Punctata-Formen und Typen und zur Theorie der Infektiösen Bauchwassersucht der Karpfen". *Zbl. Bakt. Orig. II.*, 105: 49, 1942.
- CASELITZ, F. H., und MARTÍNEZ SILVA, R.: "Haemolytische Studien an *Vibrio Jamaicensis* und Verwandten Mikroorganismen". *Zschr. Tropenmed.*, 8: 28, 1957.
- MARTÍNEZ SILVA, R., und CASELITZ, F. H.: "Die Antihaemolysinbildung der Mikroorganismen vom Typ des *Vibrio Jamaicensis*, ihre Bedeutung und Problematik". *Zschr. Tropenmed.*, 8: 349, 1957.
- CASELITZ, F. H., und SCHOENN, O.: "Serologische Studien an *Vibrio Jamaicensis* und Verwandten Vibrionenstämmen". *Zschr. Tropenmed.*, 7: 350, 1956.