

Estudios del género *Shigella*¹

Por LUIS M. GONZÁLEZ, P. MORALES OTERO
y J. ENRIQUE PÉREZ

Del Departamento de Bacteriología e Inmunología de la Escuela de Medicina Tropical,
San Juan de Puerto Rico

I. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

Fracción polisacárida específica del complejo antigénico

A PARTIR de la magistral investigación de Shiga² en 1898, han aparecido numerosos trabajos sobre la etiología de la disentería bacilar, y en publicaciones recientes, resúmenes del estado actual del problema de la disentería, cuya causa, aceptada universalmente, se atribuye a la infección por bacilos pertenecientes al género *Shigella*. Como la estructura antigénica de estos microorganismos se discute aún, la comprensión de la configuración antigénica del grupo *Shigella*, simplificaría la determinación del tipo de las diferentes razas que lo componen, y se aportarían de esta manera mejores datos aplicables a la epidemiología de la disentería.

Además de los microorganismos de la clasificación de Boyd y Weil, la lista completa de los agentes bacterianos capaces de provocar la disentería comprende: el *B. dysenteriae* Sonne-Duval y el *B. alkalescens*, fermentadores de la manita, y las *S. dysenteriae* Shiga-Kruse y *S. schmitzi*, inactivos frente a la manita. Estos microorganismos comprenden 90 por ciento³ de todos los bacilos disentéricos que se conocen en el mundo. Bergey,⁴ en su manual de bacteriología, define el género *Shigella* como un grupo de bastoncillos gramnegativos y de otras especies afines, causantes de un estado patológico en que predomina la sintomatología diarréica. Entre las especies afines, algunas son posiblemente patógenas y otras presentan ciertas características interesantes que convendría conocer para poder establecer su diferenciación. Todos estos microorganismos habitan el conducto intestinal de los mamíferos.

Hasta la fecha, los intentos más valiosos realizados para establecer la estructura antigénica de las *shigelas* paradisentéricas, han sido las de Andrewes e Inman, Boyd, Wheeler, y Weil y sus colaboradores.

Clasificación de Andrewes e Inman. Con objeto de definir con

claridad los caracteres de una sola especie, la conocida ordinariamente por bacilo de Flexner, y de definir serológicamente las razas que pueden existir dentro de los límites de esa especie, emprendieron Andrewes e Inman⁵ una rigurosa tarea de investigación serológica de un gran número de cepas de dicho bacilo. Como hipótesis de trabajo, aceptaron estos investigadores la concepción de Durham⁶ de que *deben existir múltiples componentes antigénicos, con sus correspondientes aglutininas, y además, otras aglutininas que caracterizan a todo el grupo Flexner.* Propusieron estos investigadores demostrar cuántos componentes antigénicos podrían determinarse, y hasta qué punto el predominio de uno sobre otro podría ser la causa de las diferencias raciales observadas.

Estudiaron Andrewes e Inman 116 cepas diferentes, pero sólo una pequeña serie (21 cepas) fué sometida a rigurosa investigación, cuyos hallazgos habrían de ser aplicados después al estudio de toda la serie que tenían a su disposición. En el reducido grupo de bacilos estudiados, investigaron sistemáticamente (a) su aglutinación por sueros conocidos, (b) su poder aglutinogénico y (c) prueba de absorción. En los cultivos restantes sólo utilizaron la aglutinorreacción.

Aunque al principio de su labor emplearon algunos sueros de origen humano, la mayoría fué de conejos. Verificando seroaglutinorreacciones cruzadas entre algunos de sus cultivos y los sueros de que disponían, pudieron observar al instante que las cepas podían clasificarse en grupos y que en el "grupo Flexner" existían, por lo menos, cuatro componentes antigénicos, que denominaron con las letras V, W, X y Z. Cuando predominaba uno de los componentes consideraron que esto bastaba para impartirle carácter específico a la raza a que pertenecía.

Reconocieron también la existencia de dos grupos intermedios el VZ y el WX, y otro grupo, el Y. Las conclusiones respecto a este último grupo no son tan convincentes como las referentes a las otras razas. Quizás este último grupo indica simplemente la existencia de una mezcla de distintos componentes antigénicos.

En las razas V, W, y Z observaron que predominaba un sólo componente antigénico. Las tres se comportaron, desde el punto de vista serológico, aproximadamente como si fueran tres especies

1. Recibido para publicación el 9 de enero de 1947.
2. K. Shiga, Ueber die Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*) Zentralbl.F.Bakt., 23:870-874; 913-918; 24:817-828, 1898.

3. J. Felsen, Recent advances in bacillary dysentery. N. Y. State J. Med., 42:789-793, 1942.

4. D. H. Bergey, Manual of Determinative Bacteriology, 5th ed. (Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1939).

5. F. W. Andrewes and A. C. Inman, A Study of the Serological Races of the Flexner Group of Dysentery Bacilli (London: Medical Research Committee, Special Report Series No. 42, 1919).

6. H. E. Durham, Some theoretical considerations upon the nature of agglutinins, together with further observations upon *Bacillus typhi abdominalis*, *Bacillus enteritidis*, *Bacillus coli communis*, *Bacillus lactis aerogenes*, and some other bacilli of allied character. J. Exp. Med., 3:381-388, 1900-1901.

distintas, y cada una de ellas necesitó para su perfecta aglutinación un suero perteneciente a su propia raza. Aparecieron además dos subrazas, la *VZ* y la *WX*, que se consideraron esencialmente miembros de las razas *V* y *W*, pero que contenían una proporción tan grande de un segundo componente antigénico que ello modificaba su comportamiento serológico.

La raza *X* resultó excepcional, pues sólo aglutinó levemente con su suero propio, pero en cambio, podía producir un suero aglutinante no sólo de la raza *X*, sino también de la *Z* y, hasta cierto grado, de la *V*. En cuanto a estas cuatro razas, parece evidente que las aglutininas correspondientes a cada uno de los cuatro componentes antigénicos no podían ser absorbidas, sino parcialmente, por las otras razas. De lo cual se dedujo que eran entidades distintas.

La raza *Y* presentó características serológicas distintas de las anteriores. Según Andrewes e Inman, esta raza requería también para aglutinarse un suero de su propia raza; pero dudaron estos autores que poseyese un quinto componente antigénico, o quizás podría suceder que contuviese una mezcla de los otros cuatro elementos primarios observados en las *V*, *W*, *X* y *Z*, respectivamente. Quizás también la raza *Y* poseía una estructura antigénica más primitiva que las otras.

Para corroborar sus observaciones, Andrewes e Inman verificaron seroaglutinaciones con cultivos considerados como típicos en varios laboratorios. La raza *V*, de Andrewes e Inman, resultó más o menos semejante a las cepas consideradas típicas en los otros laboratorios. La cepa "d'Herelle" del Instituto Pasteur se clasificó como correspondiente al grupo *VZ*. Ninguna cepa aglutinó con los sueros de los grupos *X* y *Z*. Muchos cultivos incluidos en el grupo *Y* por varios laboratorios, fueron clasificados en el grupo *W*, y una cepa de la raza *V* fué aglutinada casi en la misma forma por los sueros de los grupos *W* e *Y*. Sin embargo, las cepas *Y*, del Instituto Lister y de Lentz, de Berlin, correspondieron al suero *Y* de Andrewes e Inman.

En general, se pudo observar que ninguna de las razas estaba constituida por un solo componente antigénico, sino que cada una de ellas contenía otros y, en algunos casos, una segunda fracción antigénica en cantidad suficiente para poder considerar el microorganismo como perteneciente a una raza mixta.

Clasificación de Boyd. Tras una amplia investigación y análisis de más de siete mil cepas de bacilos disintéricos, aislados en la India, emprendió Boyd⁷ una nueva clasificación del grupo de *Sh. para-*

7. J. S. K. Boyd, The laboratory diagnosis of bacillary dysentery. Tr.Roy.Soc.Trop.Med. and Hyg., 33:533-571, 1940.

shigellae. El 75 por ciento, aproximadamente, de los microorganismos del grupo Flexner, lo incluyó en 5 grupos de la clasificación Andrewes e Inman; el resto lo catalogó dentro de nuevos tipos descubiertos por él.

Boyd fundó su clasificación en el hecho de que cada microorganismo del grupo Flexner poseía un antígeno tipoespecífico, pero que ellos tenían además un antígeno común a todos los miembros del grupo. Debido a que la cepa varía de características cuando se conserva en cultivo artificial durante algún tiempo, la tipoespecificidad antigénica puede perderse parcial o totalmente, y producirse entonces un aumento, aparente o real, del antígeno común al grupo. Las características distintivas de los microorganismos, que dependen, indudablemente, del antígeno típico, desaparecen, y se produce entonces una regresión a un tipo común para todas las razas. En algunas de éstas, en las que se produce una variante carente del antígeno tipoespecífico, la mutación progresó rápidamente; en otras, que no pierden completamente la fracción tipoespecífica, el proceso de mutación puede quedar en estado de equilibrio, aún cuando para llegar a este estado quizás sea necesario que transcurran varios años.

Según la hipótesis de Boyd, el antígeno tipoespecífico constituye una característica individual especializada, adquirida recientemente, localizada en la superficie de la bacteria, o levemente adherida a ella, mientras que el antígeno grupal constituye un carácter primitivo y permanente, más profundamente enraizado o más íntimamente fundido con el cuerpo bacilar. Tras un estudio más minucioso, pudo demostrar Boyd que este antígeno grupal posee una estructura más compleja de lo que se creyó en un principio y que contenía varios componentes.

En su clasificación conservó las razas *V*, *W* y *Z* de Andrewes e Inman, por considerarlas verdaderos tipos, cada uno con su antígeno propio, y todos con mayor o menor cantidad del antígeno común a todo el grupo, de lo cual, según él, dependían las reacciones cruzadas que se daban entre unas y otras razas. El subgrupo *VZ* fué considerado por Boyd como perteneciente a la raza *V*, con el antígeno tipoespecífico de esta raza, pero poseyendo además en exceso cierto componente grupal, también existente en el grupo *Z*.

Al tipo *X* lo consideró como una variante imcompleta del *Z* y no una raza aparte, pero admitió la posibilidad de que pudiese existir en Europa la cepa primitiva *X* descrita por Andrewes e Inman, aunque no hubiera sido encontrada aún en la India. La raza *Y* no la creyó un tipo verdadero, sino en degeneración, habiendo perdido su antígeno tipoespecífico, y quizás fuese una variante de la *W*.

Los otros tipos de la clasificación de Boyd son: el 103, el P 119 y el grupo 88-Newcastle-Manchester. Mencionó Boyd, además, varias otras cepas de escasa importancia, porque no se encuentran frecuentemente, de las cuales sólo conservó en su clasificación tres que se observan más a menudo. Véase la clasificación de Boyd en el cuadro 1.

CUADRO 1
Clasificación, según Boyd

Nueva nomenclatura	Nomenclatura anterior
<i>B. dysenteriae</i> Flexner I	Andrewes & Inman V
<i>B. dysenteriae</i> Flexner II	Andrewes & Inman W
<i>B. dysenteriae</i> Flexner III	Andrewes & Inman Z
<i>B. dysenteriae</i> Flexner IV	Tipo 103
<i>B. dysenteriae</i> Flexner V	Tipo P 119
<i>B. dysenteriae</i> Flexner VI	Grupo 88-Newcastle-Manchester
<i>B. dysenteriae</i> Boyd I	Tipo 170
<i>B. dysenteriae</i> Boyd II	Tipo P 288
<i>B. dysenteriae</i> Boyd III	Tipo D1

El tipo racial 103 se diferencia de las otras razas en que su antígeno grupal se puede observar, aunque "algo oscurecido," en las cepas aisladas recientemente, pues el microorganismo apenas da seroglutinaciones cruzadas con sueros de otros miembros de este grupo. El P 119, al igual que el 103, produce ciertas variantes, en las que no existe el antígeno tipospecífico, pero en cambio, posee antígeno grupal en abundancia. Creyó Boyd que esta raza existía en el Lejano Oriente y en el Sur de Africa, pero hasta ahora no se la ha encontrado en Europa.

Relaciones antigénicas, según Wheeler. Las observaciones de Wheeler⁸ concidieron, en general, con las de Boyd, aunque con leves diferencias referentes principalmente a la distribución de los componentes grupales entre los tipos. Wheeler, de acuerdo con lo demostrado por Boyd, aceptó que pudiera existir una pérdida del antígeno tipospecífico como resultado de la variación, y trató entonces de conservar la forma lisa en sus cultivos, guiándose por las propiedades culturales de sus cepas.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con trescientas cepas de *Sh. paradysenteriae*, coincidieron, con leves excepciones, con los estudios realizados por él mismo de los cultivos patrones. Esto

parecía indicar que en las cepas estudiadas por Wheeler no había ocurrido mutación alguna; es decir: no existían en sus cultivos antígenos característicos de "cepas rugosas."

Las cepas patrones utilizadas por Wheeler procedían de distinto origen: *Standard Laboratories, U. S. Public Health Service*, Departamento de Sanidad de la provincia de Quebec, Instituto de Higiene de Montevideo, etc. Obtuvo también, procedentes de distintos sitios, trasplantes de los cultivos primitivos de Boyd y Flexner, y algunas cepas fueron aisladas en el *Bureau of Laboratories* del Departamento de Salud Pública de Connecticut. Las reacciones bioquímicas del cultivo utilizado como patrón fueron las características de los bacilos disintéricos. Todas las razas produjeron indol, excepto el tipo 88; todas fermentaron la dextrosa y la manita. Alguna acidificaron tardíamente la sucrosa.

Pudo demostrar fácilmente por los métodos de observación, la tipospecificidad antigénica en todos los tipos, excepto en el X e Y. Después que extrajo por absorción el anticuerpo grupal, la potencia de las aglutininas residuales en el antisuero X apenas podía compararse con la de los anticuerpos específicos existentes en los antisueros V, W y Z. En el antisuero de Y fué imposible determinar la presencia de aglutininas en titulación suficiente, después de verificada la absorción con cultivos de otros tipos.

En varias cepas del mismo tipo y de la misma composición antigénica grupal observó alguna variación en su sensibilidad aglutinante frente a antisueros de antígenos grupales. Esto quedó perfectamente comprobado cuando trató la cepa del tipo Z con el antisuero absorbido del tipo X. Observó asimismo cierta discrepancia en los resultados de las pruebas directas de aglutinación, absorción e inmunización. Según Wheeler, esto pudiera explicarse por la localización "superficial o profunda del antígeno" o por una "variación cuantitativa" del mismo en las distintas cepas.

Para que se vea con más claridad la concepción de Wheeler en comparación con la de Boyd, insertamos a continuación los resultados que presentan estos dos investigadores.

La complejidad de la configuración antigénica es evidente. El antígeno está compuesto por elementos existentes en varios tipos, así como también por fracciones antigénicas que poseen una especificidad precisa en un pequeño número de tipos.

Tanto Wheeler como Boyd observaron una fracción antigénica común a todas las razas y la designaron con el signo numérico arábigo 1. Wheeler notó que la cepa tipo 103 poseía un antígeno principal de grupo, que no solamente aparecía en la cepa V, sino

8. K. M. Wheeler, Antigenic relationships of *Shigella paradysenteriae*. *J. Immunol.*, 48:87-101, 1944.

CUADRO 4

Clasificación de bacilos disentéricos (Flexner), según diferentes investigadores

Weil et al.	Andrewes e Inman	Boyd
Tipo I	Tipo V	Tipo Flexner I
II	W	Flexner II
III	Z	Flexner III
IV		Flexner IV (103)
V		Flexner V (P119)
VI		Flexner VI (88)
VII	X	
VIII	Y	
IX		Boyd I (170)
X		Boyd II (P288)
XI		Boyd III (D1)
XII		Boyd D19
XIII		Boyd P143
XIV		Boyd P274
I-III	VZ	
II-VII	WX	
III-IV		
V-VII		

así: el antígeno primario está localizado en la superficie del microorganismo, donde aquél puede reaccionar frente a su anticuerpo, ocultando de esta suerte al antígeno secundario y evitando que se ponga en contacto con su anticuerpo correspondiente. Existe también la posibilidad de que el antígeno secundario esté oculto dentro de una molécula de gran complejidad perteneciente al antígeno somático, en cuyo caso, más bien que una organización de la superficie bacteriana, se trataría aquí de una estructuración intramolecular. Por último, de los experimentos de inmunización pasiva en embriones de pollos, realizados por Weil y sus colaboradores, se dedujo que la inmunización protectora dependía principalmente del antígeno primario.

Importancia de la fracción polisacárida en la especificidad antigénica. La especificidad antigénica de los bacilos disentéricos depende de la fracción polisacárida. Boivin y sus colaboradores¹¹ obtuvieron los antígenos somáticos que aparecían en forma de una

11. A. Boivin and L. Mesrobeau, Recherches sur les toxines de bacilles dysenteriques. Sur les principes toxiques du bacille de Flexner. Compt.rend.Soc.de Biol., 124:1078-1081, 1937.

L. Mesrobeau and G. Calalb, Sur l'antigène somatique glucidolipidique des bacilles dysenteriques. Propriété chimique. Compt.rend.Soc.de Biol., 122:496-497, 1936.

G. Calalb and L. Mesrobeau, Sur l'antigène somatique glucidolipidique des bacilles dysenteriques. Propriété toxique et spécifique. Compt.rend.Soc.de Biol., 122:497-499, 1936.

molécula compleja, cuya especificidad antigénica dependía de un polisacárido. Este polisacárido libre pudo extraerse por hidrólisis. Cepas de bacilos disentéricos que habían sufrido mutación y se hallaban en la "forma rugosa" no contenían dicho antígeno. Además del polisacárido, el "antigène complet" de Boivin contenía en su estructura un lípido, ácidos grasos y sustancias nitrogenadas que el autor no llegó a identificar. Estos antígenos íntegros fueron aislados en los microorganismos de *Shiga*, en los de Flexner y en los de *Shigella flexneri*.

Morgan y Partridge¹² confirmaron los hallazgos de Boivin, y emprendieron nuevos experimentos que aportaron más datos a los ya conocidos sobre este asunto. Trabajando con bacilos de *Shiga* descubrieron estos investigadores que el complejo antigénico correspondiente o existente en las "formas lisas," consistía de tres componentes principales: un polisacárido, un fosfolípido y una globoproteína, pudiendo también entrar en su composición otros elementos de menor categoría. Lograron aislar estos investigadores un polisacárido que gobierna la especificidad serológica del bacilo, uno que no existía en las "variantes rugosas," aunque sí pudieron aislar en cantidad considerable una proteína simple.

"Podríamos, pues, concebir," dicen Morgan y Partridge, "al antígeno bacteriano, tal como aparece en la célula intacta, no como un compuesto químico único de composición rígida, sino consistente en una agrupación molecular lábil, que posee un componente esencial, tal como, por ejemplo, un polisacárido de estructura química fluida y de composición fija, y del cual únicamente depende la especificidad inmunológica de dicho antígeno, y otros elementos que imparten al componente esencial sus propiedades antigénicas." Este hidrato de carbono específico es un hapteno que, aunque no activo cuando está inalterado, puede, no obstante, tener su poder característico de reacción *in vitro* frente a su antisuero. La fracción proteica en su forma natural posee un grupo prostético que contiene fósforo, del que depende su poder antigénico.

Del bacilo de la tifoidea "O"¹³ se obtuvo una proteína "conjugada" semejante a la anterior, que no se pudo distinguir química ni inmunológicamente de otra aislada en el bacilo de *Shiga*. Una proteína semejante a ésta contiene el tipo Flexner VI de Boyd. El polisacárido del bacilo disentérico en su forma natural podría combinarse con la

12. T. J. Morgan and S. M. Partridge, Studies in immunochemistry. IV. The fractional nature of antigenic material isolated from bacteriae dysenteriae (*Shiga*). Biochem.J., 34:185-191, 1940.

13. T. J. Morgan and S. M. Partridge, An examination of the O antigenic complex of *Shigella flexneri*. Brit.J.Exp.Path., 23:151-165, 1942.

proteína compuesta del bacilo tifoso para formar un complejo antigénico capaz de producir en los animales un antisuero específico para el polisacárido. Y viceversa: usando el polisacárido tifoso, en vez del disentérico, con la proteína del microorganismo disentérico, se obtendría un antisuero específico para el hidrato de carbono del bacilo de Eberth. Kurauchi¹⁴ obtuvo polisacáridos específicos de bacilos de Flexner y de Sonne. Estas sustancias han sido utilizadas para diagnosticar las infecciones disentéricas¹⁵ y para determinar los tipos del *Sh. paradyenteriae*.¹⁶

Con distintos métodos de extracción, Goebel, Binkley y Perlman¹⁷ han preparado antígenos correspondientes a varios tipos de los bacilos de Flexner, habiendo podido observar que los antígenos específicos de estas bacterias quedan comprendidos en ese grupo de complejas sustancias orgánicas denominadas proteínas lipocarbhidratadas. Con ninguno de los procedimientos utilizados se logró evitar que la sustancia antigénica no sufriese alteración química. De cualquiera de los tipos de donde procediese el polisacárido, nunca contenía proteínas ni sustancias fosfolípidas, pero siempre resultó ser el hapteno polisacárido del complejo antigénico. Estos polisacáridos se diferenciaban unos de otros en la rotación característica y en su contenido de nitrógeno, pero como no contenían proteínas ni derivados proteicos, se consideró su constituyente nitrogenado como una aminohexosa. Todos los polisacáridos produjeron azúcares reductores como resultado de la hidrólisis ácida.

El hapteno específico del tipo V contenía 2.06 por ciento de nitrógeno; el del tipo W, 3.10 y el del tipo Z, 3.37 por ciento.

Nosotros hemos logrado preparar en el laboratorio un polisacárido puro, en forma sólida, verificando su extracción por la formamida,¹⁸ y utilizándolo en estos estudios del género *Shigella*. Hicimos crecer grandes cantidades de bacilos disentéricos y procedimos a extraer el polisacárido en la forma indicada. La cantidad de reactivos utilizados estaba en proporción a la cantidad de bacterias obtenidas en cada cultivo. El polisacárido extraído se disolvía en agua destilada

14. Kurauchi (Report of K. Ando), A simple method of obtaining soluble specific substances from various bacteriae. *J. Immunol.*, 17:555-557, 1929.

15. N. M. Spasky and L. A. Dannenfeldt, Experimental preparation of specific polysaccharides of dysenteric bacteria. *Bull. Biol. et Med. Exp.*, U.S.S.R., 7:202-205, 1939.

16. L. M. González and P. Morales-Otero, A rapid method for the determination of the races of *Shigella dysenteriae* Flexner. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 51:94-95, 1942.

17. F. W. Goebel, F. Binkley, and E. Perlman, Studies on the Flexner group of dysenteric bacilli. I. The specific antigens of *Shigella paradyenteriae* (Flexner). *J. Exp. Med.*, 81:315-330, 1945.

18. L. M. González and P. Morales-Otero, *op. cit.*; Antigenic and biochemical studies of *Sh. paradyenteriae* isolated in Puerto Rico. *J. Immunol.*, 50:373-376, 1944.

una vez neutralizado con carbonato sódico, se le dializaba en agua durante 24 horas, a través de membrana de celulosa (*Vis-King*). Centrifugábamos entonces la solución del hidrato de carbono filtrábamos a través de un filtro de cristal poroso para separar los sólidos que se hubieran precipitado durante la diálisis, y tras evaporábamos el filtrado, al vacío, dentro de la refrigeradora.

El producto obtenido resultó ser una sustancia blanca, de aspecto nodoso, muy soluble en agua, que poseía propiedades antigénicas características (análogas a las del extracto formamídico que aparece escrito más adelante en este artículo) en las pruebas que hemos realizado: precipitación, floculación, fijación de complemento, con correspondientes antisueros de bacilos disentéricos. Esta sustancia resultó negativa a la prueba del biuret, de la nihidrina y de Millon. El polisacárido extraído de una cepa del tipo II (W) dió 4.44 por ciento de nitrógeno.¹⁹

Aunque Goebel y sus colaboradores extrajeron su hapteno tipo específico por medio del glicol y, nosotros, el polisacárido por medio de la formamida, ambos productos, a nuestro parecer, son semejantes. Antes de terminar creemos oportuno citar las palabras de Goebel *et al.*

Es de esperarse que un estudio de las reacciones serológicas recíprocas de los antígenos específicos purificados de los bacilos Flexner aclarará, por lo menos, aclarar en cierto modo la confusión que existe actualmente respecto al mosaico antigénico formado por el grupo *Shigella paradyenteriae*."

FORMACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LOS ANTÍGENOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE *Sh. paradyenteriae* EN LA SANGRE DEL CONEJO, EVALUADA POR PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN, PRECIPITACIÓN, FIJACIÓN DE COMPLEMENTO Y FLOCULACIÓN

La existencia de múltiples antígenos dentro de la célula bacteriana es una cosa ya aceptada universalmente. Durham²⁰ aplicó el vocablo "mosaico" para describir esta combinación de factores antigénicos en una célula individual. Andrewes e Inman,²¹ al clasificar los bacilos de Flexner, observaron cuatro componentes antigénicos distintos, uno de los cuales predominaba sobre los otros en cada tipo bacteriano e impartía el carácter específico a la raza, mientras que los otros

19. Queremos consignar nuestro reconocimiento al Dr. Conrado F. Asenjo, del Departamento de Química de la Escuela de Medicina Tropical, quien realizó los análisis químicos de las sustancias.

20. H. E. Durham, *op. cit.*

21. F. W. Andrewes and A. C. Inman, *op. cit.*

tres existían en la misma célula, aunque en menor proporción. Boyd,²² al revisar la clasificación, y composición antigénica del género *Shigella* formuló una nueva hipótesis. Un factor antigénico predominaba, efectivamente, en cada raza, pero, según Boyd, la interrelación de los diferentes tipos se debía a un antígeno complejo, común a todo el grupo. Ultimamente, Weil²³ y Wheeler²⁴ idearon una nueva configuración antigénica, fundándose en que debía existir un antígeno primario y varios otros componentes, en cada tipo bacteriano de este grupo.

Fundamentalmente, pues, todas las hipótesis anteriores concuerdan en que existe un factor antigénico primario predominante y otros componentes secundarios en menos cantidad.

La introducción de la célula bacteriana dentro de un organismo animal normal actuará como un antígeno y estimulará la producción de anticuerpos. Como la célula bacteriana contiene en sí varios componentes antigénicos, provocará la formación de un número correspondiente de anticuerpos distintos. Con objeto de observar la formación gradual de los anticuerpos correspondientes a los respectivos componentes antigénicos primarios y secundarios emprendimos, en el conejo, los experimentos que pasamos a describir.

A dos conejos normales se les administró una serie de inyecciones de una vacuna preparada de un cultivo de *Sh. paradysenteriae* tipo I. La aparición, en la sangre de estos animales vacunados, de los anticuerpos correspondientes a los componentes primarios y secundarios se determinó por varias pruebas serológicas: aglutinación, fijación de complemento, precipitación y floculación. A intervalos regulares procedióse a tomar muestras de sangre a los animales y, utilizando las pruebas arriba indicadas, se investigó el momento de la aparición de los anticuerpos homólogos y heterólogos.

Material utilizado. Las tres cepas representativas de los tipos paradisintéricos utilizadas en estos experimentos nos fueron enviadas por el Dr. A. J. Weil, de los Laboratorios Lederle, en Pearl River (New York). Los cultivos tenían los números 67-104 V, tipo I, 63-143 W, tipo II y 63-143 Z, tipo III. Preparamos una vacuna formolizada con el cultivo del tipo I para inmunizar al conejo, procediendo de la manera siguiente: de un cultivo de 24 horas de este microorganismo, en agar-triptosa (*Difco*) preparáramos una suspensión en solución salina estéril, que diluíamos hasta el grado 3

22. J. S. K. Boyd, *op. cit.*

23. A. J. Weil, *op. cit.*

24. K. M. Wheeler, *op. cit.*

del nefelómetro de McFarland. Para matar los bacilos le añadimos una solución de formalina al 0.2 por ciento (*formoldehido* ~~Lederle~~).

Para extraer del microorganismo el polisacárido que habíamos de utilizar en las pruebas de fijación del complemento, precipitación y floculación, procedimos conforme a la fórmula ya descrita en una publicación²⁵ anterior (extracción por medio de la formamida).

Experimentación. Tomáronse dos conejos, de 2.5 kg. de peso aproximadamente, y se les inyectó por vía intravenosa la suspensión salina formolizada de *Sh. paradysenteriae*, Tipo I, que acabamos de mencionar. La tanda de inyecciones duró 3 semanas, inyectando tres días seguidos, alternando con 4 días de descanso. El mismo procedimiento se siguió para obtener el antisuero correspondiente a cada tipo de *Shigella* en la prueba de precipitación.²⁶ A diferentes períodos de tiempo durante la experimentación, se sangró a los animales (véase cuadro 5) y se separó el suero del coágulo, añadiéndole mertiolato como preservativo.

CUADRO 5
Plan seguido en la vacunación y en la obtención
de muestras*

Sangre (muestra)	Fecha	Cantidad de vacuna inoculada (en cc.)
Núm. 1	Mayo 20, 1946	0.1
	Mayo 21, 1946	0.1
	Mayo 22, 1946	0.2
Núm. 2	Mayo 23, 1946	
Núm. 3	Mayo 27, 1946	0.2
	Mayo 28, 1946	0.4
	Mayo 29, 1946	0.6
Núm. 4	Mayo 31, 1946	
Núm. 5	Junio 3, 1946	0.6
	Junio 4, 1946	0.8
	Junio 5, 1946	1.0
Núm. 6	Junio 6, 1946	
Núm. 7	Junio 10, 1946	
Núm. 8	Junio 13, 1946	
Núm. 9	Junio 17, 1946	
Núm. 10	Junio 19, 1946	

* Cuando ambas operaciones se ejecutaban en el mismo día, las muestras se tomaban momentáneamente antes de verificar la inyección de la vacuna.

Prueba de aglutinación. Los antígenos utilizados para la prueba de aglutinación se prepararon con microorganismos de un cultivo en

25. I. M. González and P. Morales-Otero, *op. cit.* (16).

26. *Ibid.*

agar-triptosa inclinado, de 24 hs. (*Disco*) Extrajéronse las bacterias del cultivo con solución salina estéril y después de centrifugada se descartó el líquido sobrenadante. Con el sedimento bacteriano se preparó la suspensión salina estéril para hacer la concentración correspondiente al Núm. 2 de la escala del nefelómetro McFarland.

Preparáronse los antígenos de los microorganismos tipos I, II y III y, simultáneamente, se procedió a ejecutar las pruebas de aglutinorreacción con las muestras de sangre tomadas a los conejos, a distintos intervalos de tiempo, durante el período de inmunización. Los tubos que contenían las diluciones séricas y los antígenos, se dejaron incubar en baño de María a 37° C., durante una hora, al cabo de la cual se les ponía en la refrigeradora, hasta la mañana siguiente, en que se hicieron las lecturas.

En el cuadro 6 aparecen las titulaciones de las distintas muestras de suero correspondientes a los antígenos homólogos y heterólogos.

CUADRO 6
Aglutinación

Conejo	Antígeno	Muestras de sangre									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
308	Tipo I (V)	100	100	12,800	12,800	6,400	3,200	6,400	6,400	6,400	6,400
	Tipo II (W)	0	0	800	1,600	1,600	1,600	3,200	1,600	1,600	800
	Tipo III (Z)	0	0	1,600	1,600	800	800	1,600	800	800	800
313	Tipo I (V)	100	100	12,800	12,800	12,800	12,800	6,400	12,800	12,800	6,400
	Tipo II (W)	50	100	1,600	6,400	3,200	3,200	1,600	1,600	1,600	1,600
	Tipo III (Z)	0	0	1,600	1,600	3,200	1,600	800	1,600	1,600	1,600

Prueba de precipitación. En las pruebas de precipitación se utilizaron como antígenos los extractos polisacáridos obtenidos de los cultivos de *Sh. paradysenteriae* tipos I, II y III. La técnica seguida en las pruebas de precipitación con los sueros de los dos animales de experimentación, fué descrita por nosotros en un trabajo anterior.²⁷

Los resultados de este experimento aparecen en el cuadro 7.

Prueba de fijación del complemento. Los antígenos utilizados en esta prueba fueron extractos polisacáridos de *Sh. paradysenteriae*, tipo I, II y III. Para poder reunir suficiente cantidad de esta sustancia polisacárida y preparar las soluciones concentradas de los antígenos, los cultivos se hicieron en agar-triptosa (*Disco*), en frascos

CUADRO 7
Precipitación

Conejo	Antígeno	Muestras de sangre									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
308	Tipo I (V)	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tipo II (W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
313	Tipo I (V)	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tipo II (W)	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0

de Blake, cinco para cada cepa. Extrajéronse entonces las bacterias del cultivo con solución salina, separándolas por centrifugación. Como disponíamos de una mayor cantidad de material bacteriano para nuestro trabajo, hubo que aumentar proporcionalmente la cantidad de formamida, alcohol ácido y acetona: proporción diez veces más que la ordinariamente usada en la clasificación de los tipos de los bacilos disintéricos. El precipitado final obtenido después de agregar la acetona, se disolvió en 3 ml. de solución salina. Esta solución antigénica se neutralizó con solución decinormal de sosa cáustica, utilizando como indicador externo rojo de fenol por el método de la plancha de porcelana de platillos seriados. La dosis de antígeno que había de usarse en cada prueba, se determinó titulando la fijación de complemento en el antisuero de un conejo del que sabíamos que producía una fuerte precipitación con la solución del polisacárido antigénico correspondiente. En la prueba de fijación de complemento se procedió como sigue: mezcláronse varias diluciones de suero de conejo inactivado con dosis de antígeno y complemento procedentes del cobayo, que habían sido determinadas previamente por titulación, y se dejó la mezcla en la refrigeradora (temp. 6° C) durante cuatro horas para que se verificase la fijación. Se le agregaron entonces las células de carnero ya sensibilizadas, y la mezcla se puso a incubar en baño de María durante de 15 minutos, a 37° C., tras lo cual se centrifugó y se anotaron los resultados. En los cuadros 8a y 8b aparecen los datos correspondientes a estas pruebas.

27. *Ibid.*

CUADRO 8a

Fijación de complemento: Conejo 308

Cantidad de suero	Antígeno	Muestras de sangre									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.05 cc.	Tipo I (V)	0	1	2	2	4	3	3	3	3	2
	Tipo II (W)	0	0	0	0	3	0	1	1	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	1	1	4	1	1	1	1	0
0.02 cc.	Tipo I (V)	0	0	3	3	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)			0	0	2	1				
0.02 mil. de una dilución a 1/2	Tipo I (V)	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0.02 mil. de una dilución a 1/4	Tipo I (V)	0	0	3	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.02 mil. de una dilución a 1/8	Tipo I (V)	0	0	2	3	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										
0.02 mil. de una dilución a 1/16	Tipo I (V)	0	0	0	0	4	4	4	4	4	1
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										
0.02 mil. de una dilución a 1/32	Tipo I (V)	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										

CUADRO 8b

Fijación de complemento: Conejo 313

Cantidad de suero	Antígeno	Muestras de sangre									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.05 mil.	Tipo I (V)	0	0	0	0	0	1	3	3	3	2
	Tipo II (W)	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05 mil.	Tipo I (V)	0	0	0	3	3	3	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0.02 mil. de una dilución a 1/2	Tipo I (V)	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0		0	1	1	1	1	1	1	1
0.02 mil. de una dilución a 1/4	Tipo I (V)	0	0	2	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo III (Z)	0		0	1	1	1	1	0	0	0
0.02 mil. de una dilución a 1/8	Tipo I (V)	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										
0.02 mil. de una dilución a 1/16	Tipo I (V)	0	0	0	2	4	4	4	4	2	2
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										
0.02 mil. de una dilución a 1/32	Tipo I (V)	0	0	0	0	4	3	2	0	0	0
	Tipo II (W)										
	Tipo III (Z)										

Prueba de floculación. Para esta prueba se prepararon las soluciones antigénicas en la misma forma descrita para la de fijación de complemento, y se procedió de acuerdo con la técnica que aparecerá descrita más adelante en este artículo (parte V).

En el fondo de un tubo de Wassermann se ponían 0.02 ml. de una solución de colesterol al uno por ciento en alcohol absoluto y se le agregaba lentamente un ml. de solución suficientemente concentrada del antígeno polisacárido, agitando vigorosamente la mezcla durante un minuto. En cada una de las cavidades de la platina especial de floculación de Kline, se ponían 0.05 ml. del suero de conejo que se

trataba de investigar, añadiendo una gota de la emulsión del antígeno en colesterol (aprox. 0.008 cc.). Poníase la platina en la máquina de rotación durante cuatro minutos, al cabo de los cuales se leían los resultados bajo el microscopio, interpretando las reacciones positivas de acuerdo con las normas establecidas en la parte V de este artículo. Los datos correspondientes aparecen en el cuadro 9.

CUADRO 9
Floculación

Conejo	Antígeno	Muestras de sangre									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
308	Tipo I (V)	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	Tipo II (W)	0	0	0	1	3	2	3	2	1	1
	Tipo III (Z)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
313	Tipo I (V)	0	0	4	4	4	4	4	4	4	3
	Tipo II (W)	0	0	2	3	4	3	2	1	0	0
	Tipo III (Z)	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0

Comentarios. Los datos demostraron que, al inyectar en un conejo normal células bacterianas del grupo *Shigella*, se producen anticuerpos correspondientes a los antígenos primarios y secundarios. Los anticuerpos de los componentes antigénicos primarios siempre aparecían en el suero en titulaciones más elevadas que los de los antígenos secundarios, lo cual parece indicar que aquellos componentes existen en la estructura antigénica celular en mayores cantidades que los segundos, o quizás los antígenos primarios tenían una estructura más apta para estimular la producción de inmunocuerpos.

Según la terminología usual, a las aglutininas, precipitinas, opsoninas y anticuerpos fijadores de las alexinas, etc. se les denomina inmunocuerpos; pero la hipótesis unitaria, casi universalmente aceptada hoy día, no reconoce más que una sola clase de anticuerpos. Dean²⁸ logró demostrar la identidad de los anticuerpos precipitantes y los fijadores de las alexinas. Heidelberger y Kabat²⁹ han asegurado que aglutininas y precipitinas son una misma cosa, y que la aglutina-

28. H. R. Dean, The relation between the fixation of complement and the formation of a precipitate. Roy.Soc.Med. (Path., Sec. T), 5:62-103, 1911.

29. H. Heidelberger and E. A. Kabat, Chemical studies in bacterial agglutination. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 31:595-598, 1934.

ción de las bacterias puede ser considerada como una precipitino-reacción que tiene lugar en la superficie de las células bacterianas. Si una aglutinina y una precipitina fueran el mismo anticuerpo, y una precipitina fuese idéntica al anticuerpo que fija las alexinas, entonces los tres elementos constituirían una sola y única entidad, y la diferencia de actividad funcional no dependería de la naturaleza del anticuerpo mismo, sino de la diferencia en la estructura de los antígenos o de las condiciones o circunstancias bajo los cuales la reacción recíproca antígeno-anticuerpo tuvo lugar.

Esta concepción de las reacciones séricas no descarta el hecho de que antígenos múltiples provoquen la formación de una multiplicidad correspondiente de anticuerpos. Cada uno de estos múltiples antígenos que constituyen el complejo mosaico antigénico de cada célula bacteriana, estimulará la génesis de anticuerpos en cantidades variables. En la aglutinorreacción, el antígeno que se utiliza es la célula bacteriana intacta, y, por consiguiente, todo el complejo mosaico antigénico de la superficie celular queda expuesta a la acción de los anticuerpos. Toda la complicada agrupación química del llamado complejo proteocarbhidratolipoide aparece expuesto en su forma natural intacta, a la acción recíproca de sus correspondientes anticuerpos. Los antígenos quedan sometidos a la influencia de sus respectivos anticuerpos en las mismas condiciones en que se encontraban cuando provocaron la formación de éstos en el cuerpo del animal (en el supuesto de que no hayan sufrido aquella alteración alguna antes o durante la formación de los anticuerpos). Si fuéramos a considerar la aglutinorreacción como la combinación ideal antígeno-anticuerpo, ésta combinación habría de efectuarse de una manera más perfecta, y la presencia, entonces, de los anticuerpos en el suero, podría descubrirse antes que por otros métodos de menos precisión y de menos sensibilidad.

El antígeno que hemos usado en este experimento para las pruebas de precipitación, fijación de complemento y floculación, es una sustancia polisacárida, que se extrae de la célula bacteriana por procedimientos químicos. Es, pues, un antígeno incompleto: un hapteno. Este polisacárido formaba parte del "antígeno completo," pero su combinación con los anticuerpos no podrá ser tan "perfecta" como la reacción antígeno-anticuerpo en el fenómeno de aglutinación. No solamente el antígeno usado por nosotros en estas pruebas es una parte de la totalidad del mosaico antigénico de los bacilos shigelósicos, sino que también la cantidad utilizada es muy pequeña y, además, muy diluida en solución salina. La sustancia reactiva perteneciente a los antígenos secundarios celulares, habría de estar en

proporción inferior a la fracción polisacárida de los componentes primarios y, por consecuencia, en cantidades mínimas.

La aglutinorreacción en este experimento reveló un alza súbita de las aglutininas correspondientes a los tres antígenos, después de siete días de haber administrado la primera dosis de la vacuna. En todos los casos, las titulaciones de los sueros correspondientes al antígeno primario (tipo I), fueron notablemente más elevadas, y menores las correspondientes a los factores secundarios (tipo II y III). Descendió levemente la titulación sérica correspondiente a todos los antígenos en las últimas muestras de sangre, tomadas a los ocho días, aproximadamente, después de inyectada la última dosis de vacuna.

La precipitinorreacción comenzó a ser fuertemente positiva para el antígeno primario siete días después de la primera inoculación y así continuó durante todo el período experimental. Las precipitinas correspondientes a los componentes secundarios sólo se pudieron demostrar en las muestras de sangre números 4 y 5 de un conejo (313) y, para el antígeno III, únicamente en la quinta muestra de otro animal (308). La precipitinorreacción positiva, en las muestras números 4 y 5 del conejo 313, coincidió con la titulación más elevada de aglutininas observada por medio de la aglutinorreacción.

Según demuestra la prueba de fijación de complemento, los anticuerpos correspondientes a los factores antigénicos primarios se pudieron determinar a partir de la tercera muestra hemática y su nivel permaneció aproximadamente siempre el mismo durante todo el experimento. Los anticuerpos fijadores de complemento correspondientes a los componentes antigénicos secundarios aparecieron en las muestras hemáticas obtenidas entre el décimo y decimoquinto días después que se administró la primera dosis inmunitante; pero las reacciones entonces fueron algo débiles, lo cual indicaba la baja titulación de los anticuerpos.

La prueba de floculación confirmó lo observado en las otras reacciones serológicas. Los anticuerpos correspondientes al antígeno primario aparecieron desde la tercera muestra de sangre, siempre en titulación elevada, y así continuaron durante el resto del período de experimentación. Ambos componentes secundarios reaccionaron evidentemente ante el suero, comenzando la reacción a eso del décimo día de iniciada la inoculación, disminuyendo después o desapareciendo en las dos últimas muestras hemáticas.

De los datos que aquí presentamos, se deduce que la aglutinorreacción parece ser más sensible para evaluar leves cantidades de anticuerpos, que las pruebas de precipitación, fijación de comple-

mento o de floculación. Dadas las condiciones en que se verificaron estos experimentos, las titulaciones de los anticuerpos tendrían que alcanzar cierto nivel antes de que pudiera ser demostrada su presencia por medio de las últimas tres pruebas que hemos mencionado. A juzgar por nuestras observaciones, antes de que pueda demostrarse la presencia de inmunocuerpos por medio de las pruebas de precipitación, fijación de complemento o floculación, debe establecerse cierto umbral. Este umbral parece haberse traspasado cuando las aglutininas existentes alcanzaban un valor aproximado de 3,000.

En un artículo de Doak, Halbert, Smolens y Mudd,³⁰ al comparar la reacción de los conejos y ratoncillos ante la vacunación con *Sh. paradysenteriae*, aseguran que, en un conejo inmunizado contra el tipo II, los valores de las aglutininas frente al antígeno homólogo alcanzaban a 32,000, mientras que los mismos valores para el antígeno del tipo III sólo llegaron a 2,000. Utilizando un extracto polisacárido purificado, observaron que se producía precipitación frente al antígeno homólogo, pero no frente al heterólogo. Repetido el experimento con una vacuna de bacilos del tipo III, se observó que aunque el nivel de las aglutininas para el tipo II ascendió hasta 4,000, no se produjo precipitación con el extracto polisacárido de este tipo de *Shigella*.

La glutinorreacción dió mejor resultado cuando tratamos de determinar cantidades pequeñas de inmunocuerpos en la sangre. Probablemente, además de la fracción polisacárida, había otros componentes antigénicos que tomaban parte en la reacción y contribuían a hacer la prueba más sensible, aunque con frecuencia ocurrían reacciones cruzadas con los antígenos grupales. La causa de este fenómeno de aglutinación se debía a la acción recíproca de ambos antígenos, primario y secundario, sobre sus respectivos anticuerpos.

En los antisueros obtenidos en conejos, con microorganismos del grupo disentérico, los inmunocuerpos correspondientes a los antígenos primarios aparecían generalmente en cantidades mucho mayores que los correspondientes a los antígenos secundarios. Como es necesario que exista cierta concentración de anticuerpos antes de que pueda aparecer la precipitinorreacción, la fijación de complemento y la floculación, gracias a ésta diferencia de valores entre los inmunocuerpos correspondientes a los antígenos primarios y secundarios pudimos hacer uso en estos casos de un antisuero sin absorber. Este suero sin absorber actuó selectivamente sobre el antígeno y se comportó como si fuera un antisuero monovalente.

30. B. E. Doak, S. P. Halbert, J. Smolens, and S. Mudd, A comparison of rabbit and mouse antisera to *Shigella paradysenteriae*. J. Immunol., 52:113-120, 1946.

En la determinación del tipo en los cultivos de microorganismos del grupo *Shigella*—sobre todo, cuando se trataba de clasificarlos de acuerdo con sus antígenos primarios, según recomiendan Weil³¹ y sus colaboradores—nosotros creemos que la precipitinorreacción ofrece la ventaja de que los antisueros que han de utilizarse no necesitan estar absorbidos. Además, la prueba puede ejecutarse rápidamente y no se requiere gran experiencia para interpretarla.

Resumen. A partir de la inyección parenteral a un conejo, de una vacuna preparada con un cultivo de *Sh. paradysenteriae*, produjéronse anticuerpos correspondientes a componentes antigénicos primarios y secundarios de la célula bacteriana. Los inmunocuerpos correspondientes a la fracción antigénica primaria, siempre aparecieron en mayor cantidad que los correspondientes a los segundos factores. Al sétimo día de haber inyectado por primera vez la vacuna prodújose un alza súbita de la cantidad de anticuerpos correspondientes a todos los componentes.

Quedó demostrado que la aglutinorreacción es la mejor prueba serológica para apreciar pequeñas cantidades de anticuerpos existentes en el suero. Sin embargo, la cantidad de los inmunocuerpos debe alcanzar cierto nivel antes de que pueda ésta apreciarse por medio de las pruebas de floculación, fijación de complemento o precipitación.

A juzgar por los resultados obtenidos, la floculación parece ser más sensible que las dos últimas pruebas mencionadas.

La precipitinorreacción es la más conveniente para demostrar la presencia de anticuerpos en los sueros cuando se trata de componentes antigénicos primarios, pues para que esta reacción se produzca se requiere que los valores de los anticuerpos en el suero sean elevados—lo cual no sucede con los inmunocuerpos secundarios—y, por consiguiente, es posible utilizar un suero no absorbido.

III. ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS POR MEDIO DE PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN

La existencia de un antígeno primario, o predominante, que caracteriza cada uno de los tipos bacterianos del género *Shigella*, es cosa admitida por todos los investigadores,³² los cuales han ideado diferentes esquemas para la clasificación de este grupo de bacilos. Este antígeno íntegro es, probablemente, el mismo complejo antigénico ("completo") descrito por Boivin y Mesrobeau,³³ con-

31. A. J. Weil, J. Black, and K. Farsetta, *op. cit.*

32. F. W. Andrewes and A. C. Inman; J. S. K. Boyd; K. M. Wheeler; A. J. Weil, J. Black, and K. Farsetta, *op. cit.*

33. A. Boivin and L. Mesrobeau; G. Calalb and L. Mesrobeau, *op. cit.*

firmado por Morgan y Partridge,³⁴ consistente en una sustancia proteocarbohidratada que contiene fósforo. La tipospecificidad de las diferentes razas de bacilos disentéricos depende de su componente polisacárido, pues la proteína que contiene no es un elemento tipospecífico.

En la Parte II de este estudio aparecen los datos demostrativos de que la precipitinorreacción es especialmente apropiada para comprobar en el suero de los conejos la existencia de los anticuerpos correspondientes a los antígenos primarios del *Sh. paradysenteriae*. Para que dicha precipitación pueda notarse, los anticuerpos deberán sobrepasar una titulación correspondiente, aproximadamente, a 3,000, en las aglutininas. En el antisuero del conejo, los inmunocuerpos correspondiente al antígeno primario aparecieron en cantidades más considerables que los secundarios. En general, estos últimos inmunocuerpos no pudieron descubrirse hasta tanto que su titulación traspasó el umbral necesario para que la precipitinorreacción fuese visible. Este hecho ofrece la ventaja de que, si el antisuero ha sido obtenido correctamente, puede utilizarse en la prueba, sin absorber sus anticuerpos secundarios, y se comporta igual que si fuese un suero monoespecífico. Puede, por consiguiente, utilizarse para apreciar la existencia de los componentes antigénicos primarios en las diferentes razas de *Shigellas*. Se han empleado métodos diferentes para extraer el componente polisacárido del complejo antigénico, con la idea de tratar de aislar dicha fracción y poderla utilizar como un antígeno que sirviese para diagnosticar la disentería bacilar,³⁵ así como también en la clasificación de los diferentes tipos de microorganismos.³⁶ Con el procedimiento de la formamida utilizado por nosotros (González y Morales Otero) se logró preservar el hidrato de carbono específico de estos bacilos y separarlo de los otros constituyentes antigénicos. Con la precipitinorreacción se pueden determinar los componentes polisacáridos de dichos bacilos.

En la Parte III se estudia la clasificación, de acuerdo con las reacciones observadas, utilizando la fracción polisacárida específica del antígeno. Con ésta hemos tratado de descubrir las relaciones antigénicas que pudieran existir entre los diferentes miembros del grupo *Shigella*.

Como quiera que la nomenclatura propuesta por Weil y sus cola-

34. W. T. J. Morgan and S. M. Partridge, *op. cit.* (12).

35. N. M. Spassky and L. A. Dannenfeldt, *op. cit.*

36. L. M. González and P. Morales Otero, *op. cit.* (16 and 18); F. Draper, The precipitin, agglutination, indole, and methyl red reactions of the dysentery bacilli. *Med. J. Australia*, 2:84-90, 1944.

boradores³⁷ comprende todas las razas mencionadas por todos los investigadores que se han ocupado de este problema, hemos creído conveniente continuar usándola. No obstante, para hacerla más comprensiva, hemos incluido también, además del grupo Flexner, las cepas *Sh. dispar*, *Sh. alkallescens*, *Sh. sonnei*, *Sh. schmitzi*, *Sh. dysenteriae*. (Véase cuadro 4, parte I.)

Las cepas shigelósicas con que hemos trabajado nos fueron enviadas por los Drs. J. A. Weil y K. M. Wheeler, y por *The American Type Culture Collection*, utilizando además las que teníamos en nuestros laboratorios de la Escuela de Medicina Tropical, aisladas en Puerto Rico. En el cuadro 10 aparecen las distintas cepas utilizadas en nuestros experimentos.

CUADRO 10
Cepas utilizadas

Cepa	Tipo	Origen
67-104-V	I	(Clasificación de Weil) Dr. A. J. Weil
63-143-W	II	“ “ “ “ “
63-143-Z	III	“ “ “ “ “
66-1-1441	IV	“ “ “ “ “
63-143-119	V	“ “ “ “ “
63-125-125	VI	“ “ “ “ “
66-1-411	VII	“ “ “ “ “
63-143-Y	VIII	“ “ “ “ “
63-143-170	IX	“ “ “ “ “
63-143-288	X	“ “ “ “ “
63-184-D1	XI	“ “ “ “ “
2363 (Col. Boyd's M 279)	XII	“ “ Dr. K. M. Wheeler
63-143-143	XIII	“ “ Dr. A. J. Weil
63-143-274	XIV	“ “ “ “ “
79-118-3090	I-III	“ “ “ “ “
66-1-570	III-IV	“ “ “ “ “
63-143-X	V-VII	“ “ “ “ “
66-1-1268	II-VII	“ “ “ “ “
9339	<i>Sh. alkallescens</i>	Am. Type Culture Collection
M. Barr	<i>Sh. sonnei</i>	Esc. Med. Trop. S. J.
9755	<i>Sh. dispar</i>	Am. Type Culture Collection
7618 A	<i>Sh. schmitzi</i>	Esc. Med. Trop. S. J.
B-5-7	<i>Sh. dysenteriae</i> (Shiga)	Dr. A. J. Weil

Preparáronse vacunas formolizadas de cada uno de los cultivos de los distintos tipos. Los antisueros correspondientes a cada una de las cepas se obtuvieron en conejos. De cada cepa se obtuvo el ex-

37. A. J. Weil, J. Black, and K. Farsetta, *op. cit.*

tracto formamídico y se realizó la reacción de precipitación con suero homólogo y heterólogo. Como los antisueros no estaban absorbidos, se utilizaron tal como se obtuvieron de la sangre de los conejos. La técnica seguida es la misma descrita anteriormente.³⁸

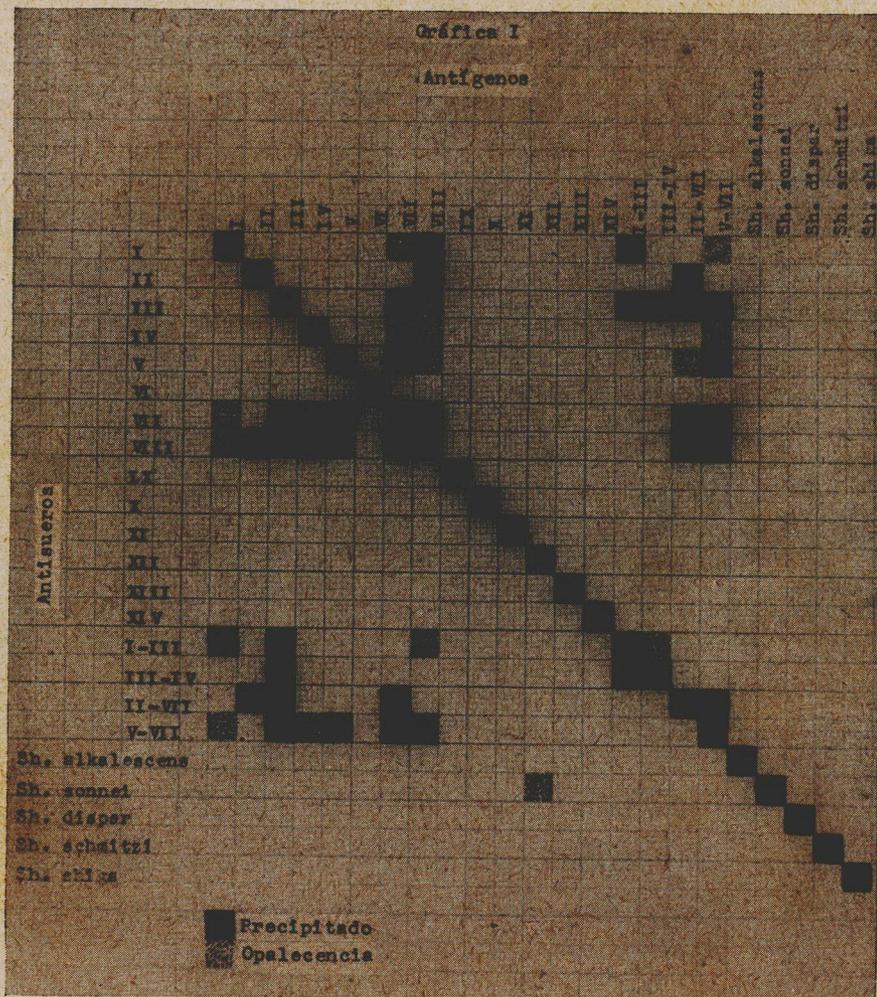
En el esquema gráfico que sigue, aparecen las reacciones de precipitación correspondientes a los diferentes antígenos y antisueros. Los cuadrángulos en trazo negro representan las reacciones de precipitación que se produjeron en los tubos, en forma de banda blanca, notándose fácilmente la precipitación en la línea de contacto entre el suero y el antígeno.

Los cuadrángulos moteados representan la precipitación opalescente en la línea de unión del antisuero y el antígeno. Las lecturas en los tubos se realizaron a simple vista, sin ayuda de lupa. En cuanto a la interpretación de los resultados, ambos casos se consideraron como de precipitación positiva.

Comentarios. Todos los cultivos de tipos patrones produjeron antisueros que se precipitaron con el extracto obtenido de cepas homólogas (véase esquema). Los tipos VI, IX, X, XI, XIII, XIV, *Sh. alkallescens*, *Sh. sonnei*, *Sh. schmitzi*, *Sh. dispar* y *Sh. dysenteriae* (Shiga) formaron precipitados solamente con sus propios antisueros. El tipo XII precipitó su suero homólogo y el antisuero correspondiente al *Sh. sonnei*. Los extractos de los tipos del I al V dieron precipitados con sus homólogos y con los correspondientes a los tipos VII u VIII, o con ambos. Los tipos VII y VIII dieron precipitados con sus correspondientes antisueros y con los de los del I al V.

Las precipitinorreacciones de las cepas representativas de los tipos (patrones) que contenían dobles antígenos (véase esquema), produjeron precipitación con más de un antisuero. El extracto polisacárido del tipo I-III precipitaron su propio antisuero así como también los de los tipos I, III y III-IV. La sustancia antigénica del tipo III-IV precipitó su propio antisuero y los de los tipos III y I-III, pero no el del IV. Además de su antisuero homólogo, el antígeno preparado con las cepas representativas del tipo II-III, precipitó los antisueros de los tipos II, III, V, VII y VIII. El otro tipo, que tenía un antígeno doble, tipo V-VII, produjo precipitación en algunos más antisueros que cualquiera de las otras cepas de antígeno doble. Además de la precipitación producida en su antisuero propio, precipitó los de los tipos siguientes: I, III, IV, V, VII, VIII y II-VII. Al analizar la precipitación de este tipo se demostró que poseía una configuración antigénica igual a la del tipo VII.

38. L. M. González and P. Morales Otero, *op. cit.* (16 and 18).



IV. INVESTIGACIÓN DE LOS ANTÍGENOS POR PRUEBAS DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

Dean⁴¹ y Dean y Webb,⁴²—estos últimos en el año 1926—demostraron la identidad esencial de las pruebas de precipitación y fijación de complemento. Algo después, en 1928, Goldsworthy⁴³ confirmó dicha observación y además llegó a la conclusión de que la precipitinorreacción y la fijación de complemento dependen ambas de una sola reacción recíproca antígeno-anticuerpo. Utilizando la prueba de precipitación hemos presentado en la Parte III de este artículo, un estudio de la estructura antigénica de los bacilos del grupo *Shigella*, tomando como base principalmente la predominancia de los antígenos primarios. En la Parte II hemos demostrado la estrecha relación existente entre las pruebas de fijación de complemento y precipitación, cuando se trata de comprobar los anticuerpos formados en la sangre de conejos inmunizados con microorganismos del grupo Flexner. Como creemos suficientemente comprobada la existencia de un elemento único—concepto unitario—, en las recipitinas y en los inmunocuerpos fijadores del complemento, en esta parte de nuestra investigación hemos tratado de confirmar mediante pruebas de fijación de complemento, los observaciones anteriores respecto a la precipitinorreacción. Hemos hecho uso en este caso del mismo antisuero de conejos, obtenido con los diferentes tipos de bacilos disentéricos y del mismo antígeno polisacárido extraído por el procedimiento de la formamida, y con ellos hemos realizado las pruebas de fijación de complemento. La manera de obtener el antisuero y el antígeno polisacárido fué también la misma. Para adaptar los reactivos a los requerimientos de la prueba y obtener una concentración adecuada del antígeno, procedimos de la manera siguiente: sembramos cinco frascos (Blake) conteniendo medio de cultivo de agar-triptosa (*Difco*), para cada tipo de los bacilos disentéricos.

Recolectábamos por centrifugación los crecimientos bacterianos y los depositábamos en tubos grandes (20 x 2.5 cm.), tras lo cual procedíamos a preparar el extracto antigénico por medio de la formamida (2 ml. de formamida durante 15 minutos a 150° C aproximadamente), tratando después este extracto con 5 ml. de alcohol ácido y centrifugando para separar los sólidos que se hubiesen formado durante el calentamiento. Al líquido claro sobrenadante se le

41. H. R. Dean, *op. cit.*

42. H. R. Dean and R. A. Webb, The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. *J.Path.and Bact.*, 29:473-492, 1926.

43. N. E. Goldsworthy, Experiments upon the relationship of complement-fixation to precipitation. *J.Path.and Bact.*, 31:220-235, 1928.

añadían 10 ml. de acetona (q. p.) y el precipitado obtenido se disolvía en 5 ml. de solución salina estéril. Esta solución antigénica así preparada se la neutralizaba con carbonato sódico, sirviendo como indicador el rojo fenol por el método de la plancha de porcelana de platillos seriados. El antígeno procedente de cada tipo de shigela fué titulado con sus correspondientes antisueros para fijar la dosis de su fijación complementaria. La técnica seguida consistió en preparar diferentes diluciones de la solución del antígeno que teníamos en reserva, de tal manera que pudiéramos utilizar un amplio margen de dosis en las distintas titulaciones. Empezamos siempre por dosis de 0.1 ml. de la solución pura en *stock* y se diluía hasta utilizar 0.1 ml. de una dilución al 1 x 10,000. Empleamos dos cantidades diferentes de antisuero homólogo: 0.05 y 0.02. En todas las determinaciones teníamos el suero de un conejo normal que nos servía de testigo del experimento. La mezcla de antígeno, antisuero y complemento de la sangre del cobayo se dejaba en la refrigeradora durante cuatro horas, a una temperatura de 3° a 6° C. para que se produjese la reacción de fijación; entonces se añadía la hemolisina anticarnero (amboceptor) y la suspensión de hematíes del carnero, y se dejaba todo incubando en baño de María, durante 15 minutos a 37° C. Procedíase entonces a centrifugar y anotar los resultados.

La selección de la dosis antigénica se hizo conforme a los procedimientos *standard*, o sea, aquella "cantidad que produce una fuerte reacción de 4 + en un suero de positividad conocida (4 +)"⁴⁴ será la mitad de la que se va a usar en la prueba final; y una reacción clara negativa, en un suero de negatividad conocida, será el doble de la cantidad que se usará en la prueba final."⁴⁵

Al llevar a cabo la prueba de fijación de complemento, titulábamos la dosis de antígeno obtenido de cada tipo shigelósico y la ensayábamos frente a su antígeno homólogo y a todos los otros antisueros heterólogos de los bacilos disentéricos. Para ello utilizábamos dos dosis de cada suero: una de 0.05 ml. y, otra, de 0.02 ml. El grado de inhibición hemolítica se registraba como de 4 (100%), 3 (75%), 2 (50%), 1 (25%). Los resultados aparecen en cuadro 11.

Comentarios. En el cuadro anterior aparecen los antígenos correspondientes a todas las cepas típicas (representativas) en las cuales se verificó la fijación complementaria en presencia de sus antisueros homólogos. La reacción correspondiente al tipo XII no se llevo a

44. Los antisueros que daban una intensa precipitación con sus antígenos se les consideró de una positividad de 4+.

45. J. A. Kolmer and F. Boerner. *Approved Laboratory Technic*, 4th ed. (New York: Appleton Century Co., 1945).

V. INVESTIGACIÓN DEL ANTÍGENO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE FLOCULACIÓN

La existencia de un antígeno tipospecífico predominante en los microorganismos pertenecientes al grupo *Shigella* ha adquirido una importancia extraordinaria, tanto en relación con las reacciones inmunológicas del sér infectado como en las técnicas de clasificación de los bacilos de Flexner en los laboratorios. Los factores antigénicos secundarios han demostrado escaso valor cuando se ha tratado de obtener protección (protección cruzada) para los distintos tipos de dichos bacilos, según se ha podido comprobar en experimentos profilácticos en embriones de pollo⁴⁶ y en ratoncillos domésticos.⁴⁷ Al clasificar los microorganismos del grupo disintérico, el eje de toda la labor alrededor del cual giran todas las pruebas, es la determinación de los antígenos principales. Cuando se trata de clasificar el tipo de los microorganismos, la aglutinorreacción ha tenido siempre limitadas aplicaciones, pues habría que apreciar los distintos grados de aglutinaciones cruzadas que tienen lugar cuando se hace uso de antisueros no absorbidos y, además, por la dificultad de preparar antisueros tipospecíficos, sobre todo cuando no se dispone de todos los tipos de bacilos disintéricos necesarios para efectuar la absorción.

Recientemente se ha propuesto utilizar la precipitinorreacción como procedimiento rápido para tipificar dichos bacilos⁴⁸ y para estudiar la estructura antigénica del grupo. En la Parte IV de este trabajo hemos ratificado las observaciones hechas con pruebas de precipitación, en las cuales utilizamos los mismos antígenos y antisueros que en las pruebas de fijación de complemento.

En esta parte de nuestra labor hemos de presentar la prueba de floculación como un procedimiento de pronta ejecución y fácil de interpretar cuando se trate de pesquisar los antígenos primarios de los bacilos disintéricos.

La existencia en los microorganismos shigelósicos de un hidrato de carbono soluble y específico en cada uno de ellos, sustancia que domina e imparte su característica a las reacciones inmunológicas, ha sido ya descrita por varios investigadores.⁴⁹ La extracción de esta sustancia polisacárida por medio de la formamida ha demostrado ser muy conveniente y nosotros hemos aplicado el mismo procedi-

46. A. J. Weil and J. McFarlane, Protection of the developing chick embryo with specific serum against infection with *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J. Immunol.*, 48:291-296, 1944.

47. J. Smolens, S. P. Halbert, S. Mudd, B. W. Doak, and L. M. González, Studies with the somatic antigen of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J. Immunol.*, 52:41-58, 1946.

48. L. M. González and P. Morales Otero, *op. cit.* (16).

49. L. M. González and P. Morales Otero, *op. cit.* (16 and 18). F. Draper, *op. cit.*

miento para obtener el antígeno a usarse en las pruebas que aquí presentamos. Los antisueros correspondientes a las diferentes razas de shigelas fueron también preparadas en la forma descrita anteriormente. En cuanto a la nomenclatura para designar las bacterias de este grupo, hemos respetado la propuesta por Weil y sus asociados.⁵⁰ Los cultivos de tipos patrones (representativos) fueron los mismos que en los precedentes capítulos.

Obtención de los antígenos. El cultivo *standard* en agar-triptosa (*Disco*) para cada bacilo disintérico se dejó incubando durante 24 horas en frascos (Blake) de una pinta de capacidad. Para separar las células del crecimiento se lavó el cultivo con solución salina y se centrifugó la suspensión en tubos grandes (20 x 2.5 cm.). Añadíase al sedimento 2 ml. de formamida, procediéndose entonces a verificar el extracto de la mezcla en baño de aceite a 150° C., de 15 minutos de duración. Después de enfriado se añadían 5 ml. de alcohol ácido y se centrifugaba nuevamente para separar los sólidos que se hubieran formado durante el calentamiento. Decantábase el líquido sobrenadante en un tubo limpio, adicionándole 10 ml. de acetona (q. p.). El precipitado así obtenido se disolvió en unos 3 ml. aproximadamente de solución salina, neutralizando después con carbonato sódico, usando como indicador rojo fenol por el método de la plancha de porcelana de platillos seriados. Finalmente se centrifugó la solución antigénica hasta que quedó un líquido perfectamente transparente, libre de partículas sin disolver.

La emulsión de antígeno para utilizar en las pruebas se preparan de la manera siguiente: en el fondo de un tubo de Wassermann se depositaban (con una pipeta graduada en 0.001 cc.) 0.02 ml. de una solución de colessterina (q. p.) al 1 por ciento en alcohol etílico. Añadíase entonces 1 ml. de la solución del polisacárido, dejándola escurrir muy lentamente por las paredes del tubo, agitando vigorosamente al mismo tiempo. Después de haber añadido toda la solución antigénica, se agitaba el tubo nuevamente por espacio de 10 a 15 segundos. Al examinar esta emulsión al microscopio (objetivo pequeño de 16 mm., ocular núm. 10) aparecía formada por numerosas partículas finísimas, sin grumos de ninguna clase.

Prueba de floculación. Verificamos la prueba en un portaobjetos con doce depresiones circulares (cada foseta de 16 mm. de diám. por 1.75 de fondo, aproximadamente) de la misma clase de las que se usan para la prueba de Kline. Con una pipeta de 0.2 cc., graduada en 0.001 cc., depositábamos 0.05 cc. de suero en cada una de las

50. A. J. Weil, J. Black, and K. Farsetta, *op. cit.*

fosetas. Se añadía entonces, con una pipeta Wright, unas gotas de la emulsión antigénica (aprox., 0.008 cc.), y se ponía el portaobjetos en la máquina de rotación por espacio de 4 minutos, tras lo cual se montaba en el microscopio y se hacía la comprobación (obj. de 16 mm., ocular núm. 10) con iluminación reducida para facilitar la observación. La interpretación de los resultados se hacía teniendo en cuenta el número y tamaño de los grumos (v. grab. 1).

Las reacciones positivas se clasificaron en cuatro grados: + cuando los grumos eran muy pequeños, y su distribución uniforme por todo el campo microscópico; ++, cuando los grumos eran grandes y de aspecto plumoso, pero que ya no se distribuían con uniformidad sino en pequeños acúmulos; +++ cuando los grumos eran grandes y más abundantes, pero en aglomeraciones más sueltas, y ++++ cuando los grumos aparecían en masas compactas de tres dimensiones, adoptando a veces una forma amorcillada.

Reacciones de floculación en los microorganismos Shigella. Preparamos antígenos coleccionados de todos los cultivos patrones de bacilos disentericos, así como también sus antisueros obtenidos del conejo. Se ensayó cada antisuero con su antígeno homólogo y con todas los heterólogos de todos los miembros del grupo que aparecen en esta investigación. Los resultados pueden verse en el cuadro 12.

A excepción de los tipos XII y II-VII, todos los antígenos dieron floculación con sus sueros homólogos. No se ensayó el microorganismo *Sh. sonnei*, porque no pudimos obtener una cepa recientemente aislada al momento de verificar la prueba. El tipo V-VII produjo floculación débil. Los tipos I, V, XIII y *Sh. schmitzi* flocularon solamente con sus sueros correspondientes. Los antígenos de los veinte tipos restantes reaccionaron con más de un suero, pero en algunos casos los otros antisueros ante los cuales reaccionaron fueron siempre procedentes de cepas patrones que poseían doble antígeno primario. Por ejemplo: el antígeno del tipo II floculó con su suero homólogo y el antisuero del tipo II-VII; el del tipo III reaccionó con su propio antisuero y con los antisueros correspondientes a los tipos I-III y III-IV. El antígeno del tipo VII floculó con un número mayor de antisueros que el extracto antigénico de ninguna otra raza, lo cual demostró la existencia de un componente común a otros tipos.

Es interesante observar que los antígenos de los tipos IV y VIII flocularon con los mismos antisueros: los de los tipos II, IV y VIII. En la Parte III ya hemos señalado la similitud de estas dos razas.

El antisuero del tipo XIII (P. 143) reaccionó ante mayor número

CUADRO 12
Pruebas de floculación

Antisueros	Antígenos														<i>Sh. alkalescens</i>	<i>Sh. sonnei</i>	<i>Sh. dispar</i>	<i>Sh. shiga</i>		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV					I-III	III-IV
I	4						3									4				
II		4		1			3	4								1		2		
III			2				2									1	3			
IV				2			1	1												
V					4		3													
VI						4														
VII							3											1		
VIII				2			3	4												
IX									3										3	
X										4									2	
XI											4									
XII																				
XIII						1		1	1	1	1	2	1					4	1	1
XIV									2				4							
I-III			2				1							4	4					
III-IV				3												3				
II-VII		1					1													
V-VII							1										1			
<i>Sh. alkalescens</i>							1											4		
<i>Sh. schmitzi</i>																			4	
<i>Sh. dispar</i>																				3
<i>Sh. shiga</i>																				4

de antígenos que ningún otro suero. No se observó reacción alguna entre este antisuero y los antígenos del grupo Flexner: los tipos I, II, III, IV, V, VII y VIII. Tampoco floculó con los antígenos de los tipos de doble componente primario, los cuales aparecen comprendidos entre los microorganismos del grupo Flexner, hecho que parece de cierta significación. Carpenter y Stuart⁵¹ han observado la relación antigénica existente entre el tipo XIII y *Sh. dispar*, y Neter⁵² había notado aglutinaciones cruzadas entre este último tipo de *Sh. paradysenteriae* y el *Sh. alkalescens*.

El antígeno de *Sh. alkalescens* floculó también con los antisueros

51. L. Carpenter and C. A. Stuart, Antigenic relationship of *Sh. dispar*, types I and II, to *Sh. paradysenteriae*, Boyd P. 143. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 61:238-240, 1946.

52. E. Neter, Antigenic relationship of various types of *Sh. alkalescens* to *Sh. paradysenteriae*. J. Immunol., 51:151-156, 1945.

de los tipos IX (Boyd 170) y X (Boyd 288), reacción cruzada que fué observada asimismo por Draper.⁵³

Los resultados aquí presentados concuerdan en sus aspectos más importantes con los datos relativos a los componentes antigénicos primarios obtenidos por la prueba de precipitación y fijación de complemento en los bacilos del grupo *Shigella*. La reacción de floculación, en ciertos casos, parece ser más sensible que las otras dos pruebas serológicas, puesto que nos descubre ciertas relaciones antigénicas no evidentes por la precipitinorreacción o fijación de complemento. Esta mayor sensibilidad puede notarse igualmente en los datos presentados antes, en la Parte II de este trabajo, cuando tratábamos de la formación de inmunocuerpos correspondientes a los componentes primarios y secundarios.

Resumen. Hemos utilizado una prueba de floculación para determinar los antígenos predominantes en los bacilos pertenecientes al género *Shigella*. El antígeno empleado en la prueba consistía en una solución del componente polisacárido del antígeno somático de los bacilos disentéricos, obtenidos por medio de la formamida, al que se le incorporó colesantina. Los antisueros se obtuvieron de conejos, mediante inmunización con una vacuna formolada de microorganismos del grupo *Shigella*.

Exceptuando los tipos XII y II-VII, todos los antígenos produjeron floculación con sus sueros homólogos. Los tipos I, V, XIII y *Sh. schmitzi* reaccionaron únicamente frente a sus sueros correspondientes. Los otros tipos flocularon con más de un antisuero, pero en la mayoría de los casos esta reacción cruzada ocurrió con antisueros de razas que tenían doble componente antigénico, uno de los cuales existía igualmente en el otro cultivo patrón.

La reacción de floculación parece ser más sensible que la precipitinorreacción o la fijación de complemento, puesto que permite descubrir ciertas relaciones antigénicas que no eran evidentes con las otras dos pruebas serológicas; sin embargo, los resultados confirman los aspectos más importantes observados anteriormente con la precipitinorreacción y la fijación de complemento.

VI. DISOCIACIÓN EN EL GRUPO *Shigella paradysenteriae* OBSERVADA EN LA REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN

Creemos haber demostrado que todos los microorganismos pertenecientes al grupo *Shigella* poseen un componente polisacárido que determina la especificidad de cada tipo bacilar. Hemos em-

53. F. Draper, *op. cit.*

pleado la prueba de precipitación frecuentemente para tipificar los bacilos disentéricos del grupo Flexner,⁵⁴ y hemos visto que por medio del procedimiento de la formamida es posible preparar rápidamente el antígeno polisacárido libre de cualquier sustancia contaminante que pudiera entorpecer la reacción anticuerpo-antigénica en la prueba de precipitación. La especificidad de ésta constituye un medio muy sencillo y conveniente para el estudio de la estructura antigénica de los bacilos del grupo *Shigella*.⁵⁵

En esta parte de nuestro artículo hemos examinado por este procedimiento un número de cultivos de microorganismos del grupo *Shigella* recientemente aislados y otros cultivos conservados durante los últimos tres años en agar-triptosa (*Disco*) para poder comparar entonces sus estructuras antigénicas.

Experimentación. Obtuvoéonse los antisueros en conejos, con arreglo a la técnica ya descrita.⁵⁶ Utilizamos para este objeto cepas de bacilos Flexner de los tipos I al VIII de la nomenclatura de Weil.⁵⁷ Este investigador nos proveyó generosamente los cultivos patrones con que hubimos de preparar nuestras vacunas. Investigamos cuidadosamente todos los cultivos para cerciorarnos de que el componente antigénico polisacárido característico del tipo a que pertenecían no había sufrido alteración alguna.

Se obtuvo el polisacárido por medio de la formamida (método de Fuller⁵⁸) de cultivos recientes de bacilos de Flexner y de cultivos que llevaban tres años en el laboratorio. Estos "cultivos viejos" en agar-triptosa (*Disco*) habían sido trasplantados de tiempo en tiempo para conservar su viabilidad.

La precipitinorreacción se llevó a cabo con antígeno procedente de cada cultivo, ensayándolo con los antisueros de los tipos del I al VIII. Los cultivos pertenecían a los tipos I, I-III, II, III, IV, VI y *Sh. sonnei*, que son los tipos aislados con más frecuencia en Puerto Rico, donde nunca se han encontrado microorganismos del tipo V.

Los esquemas gráficos que aparecen a continuación representan el análisis de las precipitinorreacciones en cada grupo. Los cuadrángulos teñidos en negro indican la precipitación; los moteados indican opalescencia.

Tipo I (V). Los cultivos recientes del tipo I dieron precipitación

54. L. M. González and P. Morales Otero, *op. cit.* (16); F. Draper, *op. cit.*

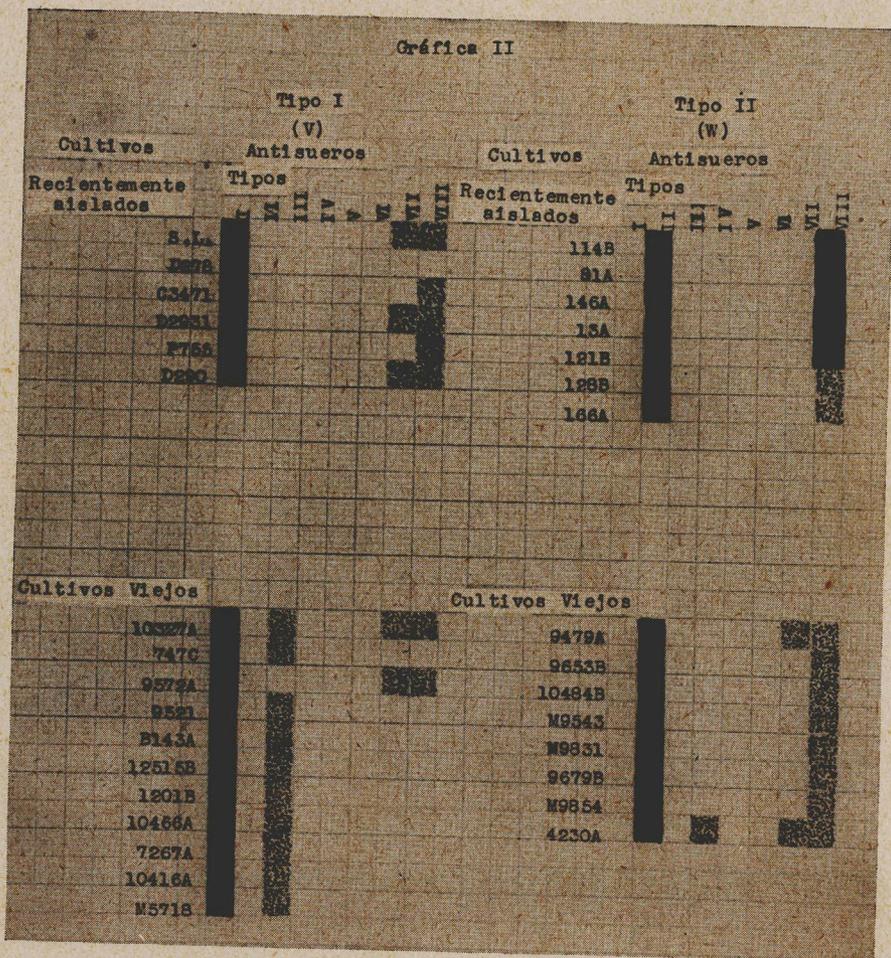
55. *Ibid.*

56. *Ibid.*

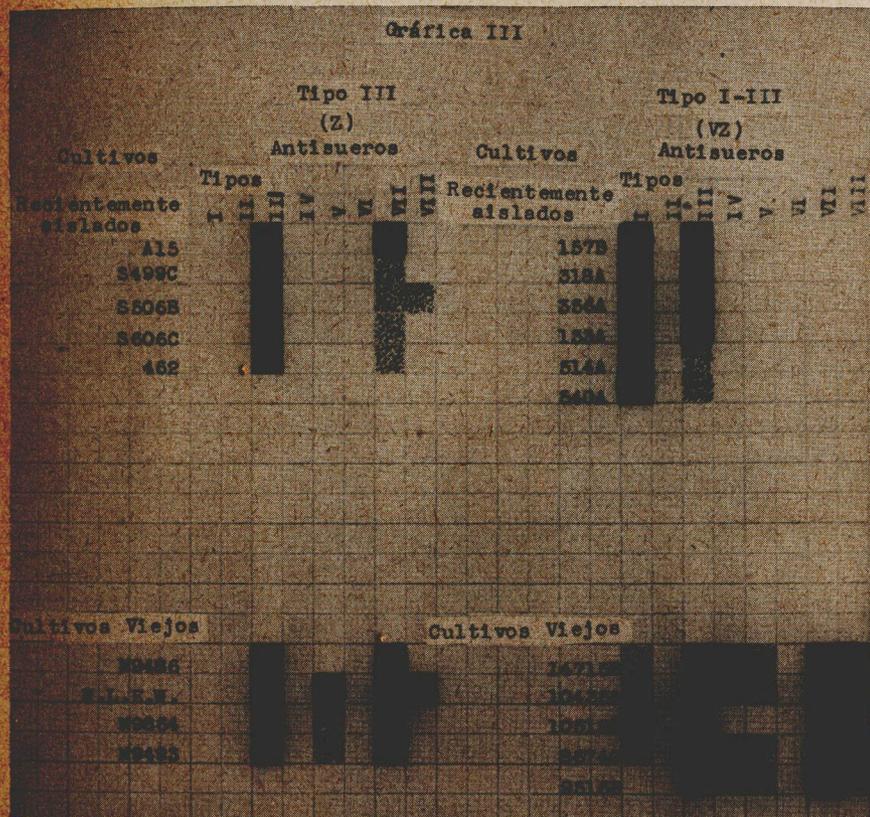
57. A. J. Weil, J. Black, and K. Farsetta, *op. cit.*

58. A. T. Fuller, The formamide method for the extraction of polysaccharide from hemolytic streptococci. *Brit. J. Exp. Path.*, 19:130-139, 1938.

Gráfica II



Gráfica III



fuerte con su antisuero (gráfica 2), pero leve con los antisueros correspondientes a los tipos VII y VIII, aunque algo más marcada en este último. Los "cultivos viejos" de este tipo dieron precipitación intensa con el suero del tipo I, y precipitación leve u opalescencia con el tipo III. Solamente en algunos pocos casos precipitó los antisueros VII y VIII.

Tipo II (W). El extracto antigénico obtenido de cultivos recientes de cepas del tipo II produjo notable precipitación en los antisueros de los tipos II y VIII (gráfica 2). El precipitado formado en el suero correspondiente al tipo II fué más abundante que en el VIII. En algunas cepas de este último tipo el precipitado fué más bien opalescente. Las cepas de este tipo de bacilo Flexner, después de haber estado largo tiempo en medio artificial de cultivo, no demostraron alteración alguna al reaccionar contra su antisuero homólogo, pero la precipitación frente al antisuero del tipo VIII fué muy moderada. Uno de los "cultivos viejos" dió también una leve precipitación con el suero del tipo IV.

Tipo III (Z). El extracto formamídico de cepas aisladas recientemente del tipo III precipitó su propio antisuero pero dió opalescencia en el antisuero del tipo VII (v. gráf. 3). Un cultivo aislado semanas antes que los otros dió un gran precipitado con el antisuero VII. Alguna que otra vez se observó opalescencia con el antisuero VIII. Además de precipitar su antisuero homólogo, las cepas del tipo III, que habían estado conservadas unos tres años en el laboratorio, precipitaron también intensamente el antisuero correspondiente al tipo VII. Prodújose asimismo precipitación en el antisuero correspondiente al tipo V, lo cual indica que el extracto antigénico contenía una fracción correspondiente a este tipo. El antisuero VIII reaccionó únicamente en presencia de una sola cepa.

Tipo I-III (VZ). Los cultivos recientes del tipo I-III dieron un gran precipitado con el antisuero I, pero sólo ligera opalescencia con el antisuero III (v. gráf. 3). Conforme los cultivos iban envejeciendo la precipitación con el antisuero III era más pronunciada. No se observó reacción con ningún otro suero.

Los "cultivos viejos" de este tipo con antígeno doble comportáronse de modo diferente que los cultivos frescos. La precipitación provocada por el extracto antigénico del antisuero correspondiente al tipo I, era entonces de aspecto opalescente, mientras que la reacción ante el antisuero III fué siempre muy intensa. Uno de los cultivos no dió reacción con el antisuero I. A juzgar por el gran precipitado formado en los antisueros correspondientes a los tipos VII y VIII, existían en ellos indudablemente fracciones antigénicas

comunes a esos dos tipos disentéricos. Observamos una leve reacción frente a los tipos IV y V. No hubo precipitación con los antisueros II y VI. La cepa Núm. 10512, aunque aislada tres años antes al igual que los otros cultivos, no dió precipitación alguna con los antisueros IV y V. La reacción ante el antisuero VIII fué muy leve, en cambio, fué notable el precipitado formado con el antisuero I. A lo que parece, la alteración sufrida por esta cepa no se produjo con la misma celeridad que en las otras aisladas al mismo tiempo.

Tipo IV (103 Boyd). El tipo IV demostró mayor grado de variación en su configuración antigénica que cualquiera de los otros tipos (v. gráf. 4). La disociación también se produjo en más breve tiempo después del aislamiento. En algunos casos la diferencia de la estructura antigénica se notó a los pocos días de haber obtenido los cultivos con siembra de material procedente de los enfermos. Los extractos antigénicos de los cultivos que habían sido aislados dos o tres días antes de realizar la prueba, produjeron notable precipitación en el antisuero IV, pero sólo leve opalescencia en el antisuero VIII. Una o dos semanas después de aisladas, las cepas comienzan a demostrar la existencia de un factor encontrado en el antisuero V. La precipitación con el antisuero VIII fué considerable, e igual sucedió con el antisuero VII.

Los cultivos del tipo IV, obtenidos hacía por lo menos tres años, dieron precipitación con todos los antisueros, excepto con el del tipo VI. Virtualmente, todas las cepas precipitaron notablemente con los antisueros IV, VII y VIII; pero con los otros sueros dieron leve opalescencia. Alguna vez observáronse cultivos que dieron notable precipitado con el antisuero V.

Tipo VI (88-Newcastle). Analizando los cultivos del tipo VI no hemos observado que el envejecimiento provocase alteración alguna en su configuración antigénica. Los microorganismos de este tipo solo precipitaban antisueros homólogos.

Tipo Sh. sonnei. Hemos comparado dos cultivos recientemente aislados de esta especie con cuatro cepas del mismo tipo que habían sido conservadas en el laboratorio durante tres años; a pesar de eso, el extracto formamídico produjo precipitación con su antisuero homólogo solamente. El antígeno de los cultivos de aislamiento reciente formó un precipitado notable en el antisuero, pero el extracto antigénico de los "cultivos viejos" produjo solamente una opalescencia en el suero.

Comentarios. Las variaciones que se producen en microorganismos

el factor I en este tipo Flexner. El factor antigénico del tipo III está adherido más profundamente, o quizás más íntimamente fundido al cuerpo bacilar. Perlman y Goebel,⁶³ en una de sus últimas publicaciones, comunican haber observado reacciones cruzadas entre los tipos I, III y I-III, de lo cual deducen que los antígenos somáticos de estas razas de *Sh. paradysenteriae* son sustancias químicas sencillas y la especificidad y las reacciones cruzadas dependen de ciertas analogías en su constitución química. Agregan además estos autores que estas semejanzas en la constitución química de los componentes polisacáridos de los antígenos somáticos de los bacilos de Flexner son, según su opinión, los que originan las reacciones serológicas cruzadas. Cuando se produce la disociación, acontece, al parecer, una alteración en la estructura del componente polisacárido, pero los autores no podrían asegurar si esta alteración se deben a una reorganización en la configuración molecular o a una variación de la estructura química.

Los resultados de nuestras investigaciones con el tipo IV (103 Boyd) parecen confirmar las observaciones de Boyd. Es indudable que la estructura antigénica del tipo VIII (Y) y los "cultivos viejos" del tipo IV son casi idénticas (v. gráf. 5). Boyd aseguró que "no hay duda alguna de que el tipo 103 es la misma cepa Y original de Lentz, que no figuró en su forma primitiva en la serie estudiada por Andrewes. Nuestras observaciones indican que al cabo de cierto tiempo de cultivo en medios artificiales el tipo IV produce variantes que son antigénicamente distintas de las cepas recientemente aisladas de este tipo. El Dr. Weil,⁶⁴ mediante la aglutinorreacción, utilizando sueros preparados por él, observó que en 14 cepas de este mismo tipo enviadas por nosotros y aisladas en distintas épocas, obtuvo numerosas reacciones cruzadas con los antisueros del I al VIII. Draper,⁶⁵ con antígenos preparados por extracción ácida, notó por medio de la precipitinorreacción reacciones cruzadas semejantes entre el tipo X y el Flexner IV (103 Boyd).

El precipitado formado por los antígenos de cultivos patrones de los tipos VII y VIII y de los variantes mutados de los tipos I-III y IV no fué cuantitativamente el mismo en todos los antisueros, lo que probablemente indica que no existe un antígeno grupal único en todos los tipos, sino una combinación de componentes antigénicos, como supone Wheeler⁶⁶ en una de sus últimas publicaciones. Boyd

aseguró que el antígeno grupal posee una estructura más compleja de lo que había supuesto y que contiene varios componentes.

La clasificación de los cultivos recientes de *Sh. paradysenteriae* por medio de la precipitinorreacción puede realizarse sin gran dificultad, puesto que los cultivos en ese momento todavía no han sufrido alteración alguna de su configuración antigénica y predominan aún en ellos los antígenos tipos específicos. Sin embargo, después de ser sometidos a sucesivos trasplantes en medios de cultivos artificiales, la fórmula antigénica se complica por la aparición de otros componentes comunes a otros tipos distintos a las cepas que se van a clasificar. Por eso es que la determinación de los tipos constituye entonces un problema algo más complicado. La precipitinorreacción, además de constituir en método fácil para diagnosticar los antígenos tipos específicos en las cepas de aislamiento reciente, nos ofrece la manera más objetiva de descubrir los componentes secundarios que pudieran haber aparecido en las cepas ya disociadas. Por lo pronto nos revela que la configuración antigénica de las distintas cepas es diferente en unas razas y otras, pero característica del tipo. De aquí que, la precipitinorreacción nos permite describir el cuadro de la arquitectura antigénica de los microorganismos cuando ya han sufrido mutación, de tal manera que pueda quedar definida con precisión la clasificación de las cepas.

Creemos asimismo que cualquier esquema que haya de intentarse para clasificar los microorganismos del género *Shigella* deberá estar fundado en el estudio de cepas bacterianas aisladas recientemente. Los intentos de clasificación fundados en análisis de la constitución antigénica de cultivos conservados en medios artificiales durante largo tiempo, pueden ser un fracaso, porque las cepas después que han sufrido mutación pueden ser confundidas fácilmente con cultivos representativos tipos específicos. Como hemos dicho antes, Boyd, creyó que Andrewes e Inman, cuando elaboraron su clásico esquema de clasificación, no tenían a su disposición la cepa Y de Lentz en su forma original.

Resumen. 1. La precipitinorreacción es un método sencillo y satisfactorio que nos permite estudiar las variaciones de las bacterias del grupo *Sh. paradysenteriae*.

2. La aplicación de éste método al estudio de "cultivos viejos" del tipo I-III después que éste había sufrido mutación, parece indicar que dichos cultivos eran semejantes a los cultivos patrones del tipo VII que teníamos en el laboratorio (X). Los cultivos patrones del tipo VII y el tipo V-VII que poseía antígeno doble, dieron reacciones de precipitación idénticas.

63. E. Perlman and W. F. Goebel, Studies of the Flexner group of dysentery bacilli. V. A quantitative study of the serological cross-reactions. J. Exp. Med., 84:235, 1946.

64. A. J. Weil, Personal communication.

65. F. Draper, op. cit.

66. K. M. Wheeler, op. cit.

3. Al analizar el tipo VIII (Y) y cultivos viejos ya mutados del tipo IV nos reveló que ambos eran semejantes.

4. Las pruebas presentadas parecen confirmar las observaciones de Boyd sobre la mutación que sufren los microorganismos del grupo Flexner.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los datos que hemos presentado indican que la titulación de los inmunocuerpos producidos en el conejo por inyección de vacunas procedentes de cultivos de *Sh. paradysenteriae*, deben alcanzar cierto nivel antes de que puedan descubrirse por cualquiera de las pruebas de floculación, precipitación o fijación de complemento, cuando se ha utilizado como antígeno el hidrato de carbono.

2. La precipitinorreacción parece ser el mejor medio de demostrar la existencia de anticuerpos en los sueros correspondientes a los componentes primarios, pues para esta reacción deben existir anticuerpos en gran cantidad, lo cual no se consigue generalmente con los inmunocuerpos secundarios, y por consiguiente pueden utilizarse en la precipitinorreacción, pero sin absorber.

3. La precipitinorreacción es un método sencillo y rápido para realizar la tipificación de los microorganismos del grupo *Shigella*.

4. A excepción de los tipos VII, VIII, I-III, II-VII y V-VII, todos los miembros del grupo *Shigella* poseen un polisacárido predominante tipospecífico que caracteriza cada tipo en particular. El tipo VII presenta factores antigénicos que se encuentran igualmente en los tipos I, III, IV, V y VIII, y al igual que en éste, el tipo VIII posee componentes antigénicos que también aparecen en los tipos I, II, III, V y VII. Los tipos I, II, III, IV y V presentan elementos antigénicos comunes con los tipos VII y VIII. El tipo XII y el *Sh. sonnei* tienen un componente antigénico común.

5. Cuando se verifica la reacción de fijación de complemento utilizando como antígeno la fracción polisacárida del microorganismo, los antígenos procedentes de los tipos VI, IX, X, XI, XIII, XIV, *Sh. alkalescens*, *Sh. sonnei*, *Sh. dispar*, *Sh. schmitzi* y *Sh. dysenteriae*, fijan únicamente el complemento con sus antisueros respectivos. Los tipos II, III, IV y V reaccionaron con sus sueros propios y con uno o ambos de los antisueros de los tipos VII y VIII. Los antígenos de los tipos VII, VIII, I-III, II-VII y V-VII reaccionaron frente a varios antisueros, lo que demostró que en su configuración antigénica existían varios componentes.

6. En la prueba de floculación todos los antígenos reaccionaron ante sus antisueros homólogos, exceptuando los tipos XII y II-VII.

Los tipos I, V, XIII y *Sh. schmitzi* reaccionaron únicamente ante sus correspondientes antisueros. Los otros tipos flocularon en más de un suero, pero la mayoría de ellos dió reacciones cruzadas con los antisueros procedentes de razas bacilares que poseían doble antígeno, uno de cuyos componentes existía también en el otro cultivo patrón.

7. Se llevó a cabo la precipitinorreacción en cultivos aislados recientemente y en cepas del mismo tipo bacilar conservadas en medio de cultivo artificial durante más de tres años. Los "cultivos viejos," según se pudo observar, demuestran cierta alteración de su configuración antigénica primitiva.

8. Los "cultivos viejos" del tipo I-III, a juzgar por los resultados de la precipitinorreacción, parecen ser enteramente iguales a los cultivos patrones del tipo VII. Los cultivos patrones, del tipo VII y el V-VII de antígeno doble, dieron idénticas reacciones de precipitación, lo que parece indicar la identidad de ambas cepas. Los estudios verificados del tipo VIII y de cultivos viejos del tipo IV revelaron que ambos eran también semejantes.

R. L. trad.