

ESTUDIO DE ALGUNOS COMPONENTES
INMUNOLOGICAMENTE ACTIVOS DE
MYCOBACTERIUM Y NOCARDIA*

DR. LUIS F. BOJALIL

DURANTE LOS últimos años hemos venido estudiando las propiedades inmunológicas de *Mycobacterium* y de *Nocardia*. El objeto fundamental de este trabajo es conocer los siguientes hechos:

1º En la actualidad la clasificación del género *Mycobacterium* continúa siendo el problema y a pesar de todos los intentos que se han hecho a este respecto todavía no ha sido posible establecer una clasificación serológica de ellos.

2º Los microorganismos considerados dentro del género *Nocardia* son ácido-resistentes como lo es el género *Mycobacterium* y por lo tanto un estudio amplio que incluyera a estos microorganismos parecía deseable.

3º El conocimiento de las fracciones inmunológicamente activas de estos microorganismos puede ayudarnos en la búsqueda de métodos serológicos que tuvieran aplicación en el diagnóstico de las enfermedades producidas por estos microorganismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. Se utilizaron las siguientes cepas: *Nocardia brasiliensis* UPHG-24, *N. asteroides* ISET-20 y *Mycobacterium fortuitum* CCH-1.

Cultivo. Se empleó el medio de Proskauer y Beck (Youmans y Karlson, 1947) se incubaron a 37°C durante 30 días, se recolectó el cultivo por filtración a partir de él; se prepararon los polisacáridos y también se utilizaron para preparación de antiseros en conejos.

Obtención de los polisacáridos. Los microorganismos se molieron y los polisacáridos se obtuvieron por precipitación en alcohol, los diferentes polisacáridos

* Trabajo de ingresos a la Academia Nacional de Medicina, presentado por su autor en la sesión del 21 de julio de 1965.

se separaron posteriormente por precipitación diferencial a pH diferentes; en la tabla 1 se muestra todo el proceso.

TABLA 1
CELULAS DESENGRASADAS, MOLIDAS CON POLVO DE VIDRIO

		Suspender en KCl 3 M Centrifugar	
Extracto			Residuo descartar
Precipitar con metanol			
Precipitado		Sobrenadante	descartar
suspender en solución reguladora de fosfatos			
D'alizar en agua de la llave.			
Precipitar con metanol el material no dializable			
Precipitado		Sobrenadante	descartar
POLISACARIDOS CRUDOS			
	Adicionar solución reguladora de carbonatos (pH 10.0)		
Extracto		Soluble en solución reguladora de citrato (pH 5.0)	
"POLISACARIDO I"		"POLISACARIDO II"	
Extraer 5 veces con cloroformo, eliminar fase de cloroformo. Al final, precipitación del polisacárido de la fase acuosa con metanol.		Extraer 5 veces con cloroformo, eliminar fase de cloroformo. Al final, precipitación del polisacárido de la fase acuosa con metanol.	
Precipitados d'solver en agua ajustada a pH 10	Descartar sobrenadante	Precipitados disolver en agua ajustada a pH 3	Descartar sobrenadante
	Adicionar Ac. tricloroacético		Adicionar Ac. tricloroacético
Precipitado descartar	Sobrenadante Dializar en agua de la llave. Precipitar el material no dializable, 2 veces con metanol.	Precipitado descartar	Sobrenadante Dializar en agua de la llave. Precipitar el material no dializable, 2 veces con metanol.
PRECIPITADO POLISACARIDO I PURIFICADO	Sobrenadante descartar	PRECIPITADO POLISACARIDO II PURIFICADO	Sobrenadante descartar

OBTENCION Y PURIFICACION DE POLISACARIDOS DE NOCARDIA

Precipitados donde se determinó nitrógeno y azúcares reductores.

Una descripción más amplia de preparación de polisacáridos ya se ha publicado (Zamora et al., 1963).

Identificación de los azúcares componentes de los polisacáridos. En algunos casos se identificaron los azúcares componentes de algunos de los polisacáridos. La identificación de azúcares se hizo por cromatografía de los hidrolizados. Se utilizó cromatografía descendente en papel Ederal N° 208, utilizando el sistema solvente n-butanol-acetato de etilo-ácido acético-agua (30:30:6:10 v/v), dejando correr el solvente 24, 48 y 72 hr, o bien utilizando la técnica de desarrollo múltiple de Janes et al., (1951), dejando correr el solvente 72 hr tres veces, después de secar cada vez el papel para separar azúcares de R_f similares (arabinosa de manosa y glucosa de galactosa). Las manchas de los azúcares se revelaron con difenilamina-anilina para azúcares reductores con fluoroglucinol para pentosas; y Elson y Morgan para azúcares aaminados (Smith, 1960).

Preparación de antisueros de conejos. Para la obtención de antisueros contra las micobacterias se utilizaron 3 conejos por cepa, sometándose cada conejo a inyecciones subcutáneas con 1 mg de células desengrasadas y homogeneizadas en 0.5 ml. de una mezcla de Bayol 55 (ESSO Standard Oil Co., Nueva York) y lanolina (9:1). Esta inoculación se repitió cuatro veces a intervalos de una semana; dos semanas después de la última inyección subcutánea, cada animal recibió tres inoculaciones intraperitoneales de 1 mg de células desengrasadas, suspendidas en solución salina a intervalos de una semana. Una muestra de 5 ml de sangre se obtuvo de los conejos diez días después de la última inyección para determinar la presencia de anticuerpos precipitantes por la técnica de difusión en agar.

Reacciones de precipitación en agar. Se utilizó la técnica de precipitación de doble difusión en agar de Ouchterlony (1949). Para la preparación de las cajas de petri, se empleó agar (Difco) al 1% en solución reguladora de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, con mertiolato 1:10,000 como preservativo. Se colocaron en cajas de petri de 50 × 15 mm, 7 ml de agar fundido, se dejó solidificar y se hicieron agujeros cilíndricos de 8 mm de diámetro, a 1 cm de distancia del agujero central a los periféricos. El fondo de los depósitos cilíndricos se selló con una gota de agar y 0.2 ml del suero se colocaron en el depósito central y 0.2 ml del antígeno soluble (polisacárido) en los agujeros periféricos. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y después de 24, 48, 72 y 96 hr se observó el número de bandas y su tiempo de aparición, en ocasiones el agujero central se hizo de 1 mm de diámetro.

Determinación de la estructura del polisacárido. La determinación de la estructura del polisacárido se hizo por oxidación con periodato y para la demostración de la configuración de los azúcares se utilizó un polarímetro y enzimas

específicas. Una amplia descripción de este método puede encontrarse en Estrada, Zamora y Bojalil, 1965.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. *Fracciones antigénicas de nocardia*. El estudio de las relaciones inmunológicas de nocardia, lo hemos enfocado buscando la existencia de polisacáridos específicos.

Se logró el aislamiento de dos polisacáridos de *Nocardia asteroides* (Poli I Na y Poli II Na) y dos de *N. brasiliensis* (Poli I Nb y Poli II Nb) Zamora, Bojalil y Bastarrachea (1963). Estos polisacáridos fueron aislados de extractos de células y purificados por precipitación con metanol, extracciones con cloroformo y desproteinización con ácido tricloroacético.

El paso crucial en la separación de Poli I y Poli II de ambas nocardias fue la solubilidad en diferentes pH. El Poli I fue precipitado a pH 10, mientras que el Poli II permaneció soluble y subsecuentemente precipitado a pH 5.

Poli I Na y Poli I Nb son aparentemente iguales; están constituidos de arabinosa y galactosa en una relación molar similar. Además Poli I Na y Poli I Nb, producen reacciones cruzadas con sueros de conejos anti-*Nocardia asteroides* o *N. brasiliensis* y cualquiera de ellos absorbe los anticuerpos del suero contra del otro. Estos polisacáridos fueron considerados grupo específico.

Los polisacáridos II, de ambas nocardias, son diferentes tanto en su composición química como en su comportamiento inmunológico, reaccionan sólo con sueros homólogos y aunque están constituidos por los mismos azúcares éstos se encuentran en diferente relación molar, de tal manera que fueron considerados especie específicos. (Tabla 2).

Los datos anteriores nos plantean varios problemas: en primer lugar, la demostración de anticuerpos en suero de individuos enfermos con el polisacárido específico, puede ayudarnos al diagnóstico de la enfermedad; en realidad esto ha sido aprobado sobre todo en individuos con mycetomas producidos por *N. brasiliensis*; en segundo lugar, encuentra aplicación en estudios de patogenicidad de estos microorganismos en animales de laboratorio; en tercer lugar, el diferente comportamiento inmunológico de estos polisacáridos puede aplicarse en la diferenciación de especie y aún sub-especies o grupos; un hecho que aún no ha sido explorado y que seguramente presentará problemas debido a que se sabe que si bien *N. brasiliensis* se comporta desde el punto de vista fisiológico como una especie bastante bien definida, *N. asteroides* por otro lado presenta tal variabilidad que sería extraño encontrar que este grupo es homogéneo desde el punto de vista inmunológico.

II. *Por lo que respecta al polisacárido I grupo específico*, hemos encontrado

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS POLISACÁRIDOS PURIFICADOS DE NOCARDIA

Polisacárido	Cepa	Nitrógeno		Proteína		Fósforo		Azúcares reductores (como glu-cosa)		Arabinosa		Galactosa		Manosa	
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Polisacárido I <i>N. asteroides</i>	ISET-20	0.67	1.27	0.70	56.5	55.6	30.5	—							
	ISET-1160	0.87	2.51	0.80	58.0	58.0	26.0	—							
	UPHG-121	0.52	1.87	0.55	55.5	53.3	30.0	—							
Polisacárido II	ISET-20	0.87	3.85	0.23	64.0	22.5	44.5	12.5							
	ISET-1160	0.78	4.89	0.10	68.0	15.5	54.5	12.0							
	UPHG-121	0.93	4.17	0.20	71.0	20.3	49.9	18.6							
Polisacárido I <i>N. brasiliensis</i>	UPHG-23	1.02	4.79	0.85	61.0	59.7	26.0	—							
	UPHG-24	1.13	5.10	0.35	56.0	57.8	26.3	—							
	UPHG-39	0.91	4.32	0.17	63.0	67.3	24.0	—							
Polisacárido II <i>N. brasiliensis</i>	UPHG-23	0.89	4.61	1.00	79.0	48.6	27.9	13.2							
	UPHG-24	1.37	6.87	0.80	76.0	48.4	27.0	13.4							
	UPHG-39	0.98	5.95	0.14	73.7	53.7	18.7	12.1							

Excepto para la determinación de proteínas que se efectuó con muestras de polisacáridos no hidrolizados, todas las otras determinaciones se efectuaron con muestras hidrolizadas con H₂SO₄N por 6 hs.

que reacciona con sueros de individuos con tuberculosis o lepra, es decir, con infecciones producidas por microorganismos ácidosresistentes, se pensó que este hecho podría tener alguna utilidad para la demostración de tuberculosis activa; los resultados obtenidos son los siguientes:

Se tomaron 38 sueros de individuos sanos tuberculino-positivos unos y tuberculino-negativos otros; en ningún caso se obtuvo una reacción positiva. Por otro lado, se seleccionaron 412 sueros de adultos con datos clínica y bacteriológicamente de tuberculosis activa; en 387 de esos casos se obtuvo una prueba positiva. El tercer estudio fue ciego y consistió de 103 individuos con diferentes enfermedades. Un cuarto estudio consistió en 87 niños con complejos primarios activos y otras formas de tuberculosis post-primarias en las que se pudo poner de manifiesto la presencia de anticuerpos. Estos resultados se anotan en las tablas 3, 4, 5 y 6.

En algunos casos se notó que algunas de las pruebas que dieron resultado negativo en individuos con tuberculosis activa eran individuos tratados por algún tiempo, por lo que se seleccionaron 29 individuos tuberculosos no tratados a los cuales se les hizo la prueba de precipitación en lapsos aproximados de 20 días

TABLA 3

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PRECIPITACION EN INDIVIDUOS SANOS

<i>Características</i>	<i>Número</i>	<i>Mantoux (P.P.D.) Positivo</i>	<i>Inmunodifusión</i>	
			<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>
A. Individuos que no trabajan en Sanatorios de tuberculosis	118	56%	0	118
B. Individuos que trabajan en Sanatorios o laboratorios de tuberculosis	20	86%	0	20
Total		71%		138

TABLA 4

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PRECIPITACION EN ADULTOS CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA

<i>Tipo de tuberculosis</i>	<i>Número</i>	<i>Precipitación</i>		<i>Porcentaje</i>	
		<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>
Tuberculosis muy avanzada	183	172	11	94.0	6.0
Tuberculosis moderadamente avanzada	229	215	14	93.5	6.5
Total	412	387	25	94	6

Nota: Algunos pacientes que dieron resultado negativo habían sido tratados por cierto tiempo.

TABLA 5
 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PRECIPITACION EN NIÑOS
 CON TUBERCULOSIS ACTIVA

<i>Tipo de Tuberculosis</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Precipitación</i>	
		<i>Positivas</i>	<i>Negativas</i>
Pulmonar moderadamente avanzada	48	45	3
Pulmonar mínima	11	11	0
Mil'ar, localización pulmonar	6	6	0
Meningea	9	9	0
Osteoarticular (Mal de Pott, coxoartritis)	6	6	0
Ganglionar	4	3	1
Peritoneal	2	2	0
Renal	1	1	0
Total	87	83	4

TABLA 6
 REACCIONES DE PRECIPITACION EN SERIE DOBLE CIEGA,
 103 CASOS ELEGIDOS AL AZAR

		<i>Precipitación</i>	
		<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>
A. Patología diversa no pulmonar (sanos pulmonares)	57	3	54
B. Patología broncopulmonar no TB	24	4	20
C. Patología pulmonar residual por TB cicatricial no activa tratada	5	0	5
Osea	1	0	1
D. Tuberculosis activa:	14	14	0
Tuberculosis pulmonar 10			
Tuberculosis ósea 1			
Tuberculosis meníngea 1			
Tuberculosis renal 1			
E. Patología pulmonar dudosa de TB			
Neumonitis	1	1	0
Pr mo-inf. (Hongos, TB)	1	1	0
Total	103	23	80

(Tabla 7), puede notarse que en algunos casos después del tratamiento la reacción se negativiza y esto generalmente corresponde con una negativización bacilos-cópica de la expectoración y frecuentemente también los cultivos se negativizan.

Otros estudios con el polisacárido I podrían ser de interés y proyectar por caminos más definidos la inmunología en tuberculosis. Hasta ahora no sabemos cuál es el papel que desempeñan los anticuerpos en esta enfermedad; hasta donde se sabe, ellos no son de tipo protector; también desconocemos los tipos de anti-cuerpos que se producen; en realidad podríamos concluir que sobre ésto todo es desconocido.

TABLA 7

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PRECIPITACION

Nº de casos	Ingr.	Días de evolución bajo tratamiento INH-E							
		21	45	58	72	86	102	120	150
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	+	+	+	+	—	—	—	—
3	+	+	+	+	+	—	—	—	—
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	—	—	—	—	—	—	—	—
9	+	+	+	+	+	+	+	+Po°	—
10	+	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	+	+	+	+	+	+	+	—Po°
12	+	—	—	—	—	—	—	—	—
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	+	+	+	+	+	+	+	—Po°
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+Po°
18	+	+	+	+	+	+	+	—	—
19	+	+	+	+	—	—	—	—	—
20	+	+	+	+	+	+	+	—Po°	—
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	—Po°
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+Po°	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+Po°	+
26	+	—	—	—	—	—	—	+Po°	+
27	+	+	+	+	+	+	+	—	—
28	+	+	+	+	+	+	+	+Po°	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+Po°	+

Nº de casos con precipitación positiva, 29 23 23 23 21 19 19 16 13

Nos parece que una metodología similar podr'a llevarnos al aislamiento de un polisacárido especie específico en *M. tuberculosis* para poder afinar así un diagnóstico serológico más definido, pero a la fecha todos los intentos han fallado; de más de 20 polisacáridos que hemos aislado de diversas especies de *Mycobacterium*, ninguno de ellos ha sido ni siquiera capaz de poner de manifiesto anticuerpos anti-tuberculosos de manera tan homogénea como el Polisacárido I, al que nos hemos referido. Sin embargo, ello ha dado a conocer mejor los componentes de diversas micobacterias lo cual podría en el futuro llevar a una clasificación serológica de ellas y a diferenciar de una manera más precisa las especies de este grupo tan extenso.

III. Si el polisacárido I, al que nos hemos estado refiriendo produce reacciones cruzadas con antisueros de varias micobacterias, esto debería ser debido a la estructura particular del polisacárido y alguno de sus componentes; por ello se decidió estudiar su estructura química y determinar posteriormente el azúcar responsable de las reacciones cruzadas. Sin pretender describir aquí toda la metodología, señalaremos sólo los puntos más importantes.

Las determinaciones cuantitativas de los componentes mostraron que el polisacárido I es un polímero de D-arabinosa y de D-galactosa en una relación aproximada de 3:1; la arabinosa parece estar en la forma furanosa, mientras que la galactosa en la forma piranosa; parece que el polisacárido tiene una cadena central compuesta por D-galactopiranosa unida en 1-3 y D-arabofuranosa unida en 1, 2 ó 1, 3 y además cadenas laterales formadas por D-arabofuranosa. Cuando el polisacárido se oxida por ejemplo con periodato, las cadenas laterales se destruyen; el polisacárido oxidado ya no precipita más en presencia de sueros antimicobacterias; esto sugiere que la arabinosa que está en las cadenas laterales es la responsable de las reacciones cruzadas.

REFERENCIAS

- Estrada Parra, S. A. Zamora y L. F. Bojalil 1965. *Immunochemical studies of the group-specific polysaccharide of Nocardia brasiliensis*. J. Bacteriol. (En prensa).
- Jeanes, A., C. S. Wise, y R. J. Dimler, 1951. *Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates*. Anal. Chem. 23, 415.
- Ouchterlony, O. 1949. *Antigen-antibody reaction in gels*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507.
- Smith, D. W., H. M. Randall, A. P. MacLenann, R. K. Putney y S. V. Rao, 1960. *Detection of specific lipids in mycobacteria by infrared spectroscopy*. J. Bacteriol. 79: 217.
- Younans, G. P. y A. G. Garlson, 1947. *Streptomycin sensitivity of tubercle bacilli. Studies on recently isolated tubercle bacilli and the development of resistance to streptomycin*. Am. Rev. Tuberc., 55, 529
- Zamora, A., L. F. Bojalil y F. Bastarrachea, 1963. *Immunologically active polysaccharides from Nocardia asteroides y Nocardia brasiliensis*. J. Bacteriol. 85, 459.