

Acción de la diálisis y de la digestión por la pepsina sobre los componentes activos de la tuberculina

por Hugo Bonfiglioli y Carlos Acuña

Es sabido que la tuberculina, obtenida por cualquiera de los procedimientos conocidos, tiene por lo menos dos propiedades:

1^o) Producir en la piel de los cobayos tuberculosos una reacción eritemato-papulosa característica (Reacción de piel), y 2^o) ocasionar la muerte de los cobayos tuberculosos cuando se inyecta por vía parenteral, a dosis muy inferiores a las tóxicas para los animales sanos, observándose en la autopsia lesiones características descritas por Koch y Doenitz con la denominación de "muerte tuberculina aguda". (Reacción sistémica).

La inyección de 0,10 ml. de tuberculina activa diluída al 1/10, produce en el cobayo tuberculoso, por vía intradérmica, una reacción eritematosa, papulosa, y a veces necrótica, que aparece a las 24 horas, se intensifica a las 48 y 72 horas y desaparece progresivamente en pocos días. Los cobayos sanos no presentan la reacción.

La inyección de 0,30 ml. de tuberculina activa, efectuada por vía subcutánea en el cobayo tuberculoso, lo mata dentro de las 24 horas, con el cuadro descrito por Koch y Doenitz: congestión subcutánea generalizada, congestión de peritoneo y pleuras con exudado claro o sanguinolento, y congestión e hipertrofia de hígado y de bazo.

La inyección de 4 a 5 ml. de la misma tuberculina no produce ningún trastorno en los cobayos sanos.

Todas las tuberculinas activas, obtenidas en caldo glicerinado o en medios sintéticos y la tuberculina P. P. D. poseen ambas propiedades.

Según la mayoría de los autores, la sustancia activa de la tuberculina no es dializable.

Sin embargo Danielopolu (1), en 1909, efectúa una serie de experiencias, en las cuales observa que el producto activo atraviesa las membranas de colodión.

Löwenstein y Pick (2) obtienen tuberculina activa dializable.

Por el contrario, las cuidadosas investigaciones de Long y Seibert y de otros autores, demuestran que la sustancia activa no es dializable, por lo menos en lo que se refiere a la capacidad de producir la reacción de piel.

Diversos investigadores han sostenido que las dos propiedades de la tuberculina son debidas a sustancias diferentes y aseguran haberlas separado por diversos procedimientos.

Dorset, Henley y Moskey (3), en 1927, dializan tuberculina obtenida en medio sintético, contra agua destilada.

Con el residuo obtienen la reacción de Mantoux positiva en cobayos tuberculosos y la muerte de los mismos con 0,20 ml. inyectados por vía subcutánea.

El dializado no da la reacción de piel pero mata los cobayos tuberculosos.

Los mismos autores (4), precipitan con sulfato de amonio la sustancia que produce reacción cutánea, pero no la mayor parte de la que mata los animales enfermos. Solamente observan esta separación con el sulfato de amonio, cuando experimentan con tuberculina vieja de pH 5.2, pero no cuando operan con tuberculinas más recientes, de pH 6,3: en este último caso, el sulfato de amonio precipita ambas sustancias.

Long y Seibert (5), precipitan con ácido acético casi toda la proteína que produce la reacción de piel, pero suponen que tal vez haya varias proteínas activas, puesto que el filtrado conserva todavía algo de actividad.

Maschmann y Küster (6) dializan tuberculina, obtenida en medio de Sauton, a través de membranas animales (vejiga de pescado). Observan que el dializado mata a los cobayos tuberculosos con las lesiones características de la reacción sistémica.

Los mismos autores (7 y 8), en 1931, separan por diálisis las dos sustancias: el residuo produce la reacción de piel y el dializado la sistémica.

Kuhlmann (9), en 1936, entre otras observaciones, confirma las experiencias sobre diálisis efectuadas por Maschmann y Küster.

Maschmann (10), en 1937, ensaya diversas tuberculinas y consigue separar dos fracciones; una con capacidad de reacción en la piel de los cobayos tuberculosos, de naturaleza albuminoidea y digerida por la proteínasa; la otra, con capacidad de matar los animales tuberculosos, no proteica y no destruída por las enzimas proteolíticas.

Tadao y Murata (11), en 1939, afirman que la fracción no dializable tiene poca capacidad tóxica y marcada capacidad cutánea, mientras la dializable es altamente tóxica hasta a pequeñas dosis.

Mueller y Howard (12), en 1926, afirman que la tuberculina digerida por pepsina o tripsina pierde la propiedad de dar la reac-

cón de Mantoux positiva, pero conserva la de dar precipitado con sueros inmunes. No investigan la capacidad tóxica.

Fichera (13) confirma esos resultados.

Pfeiffer y Persch (14) digiriendo con pancreatina, Long (15) por hidrólisis ácida y Seibert (16) efectuando la digestión con pepsina y tripsina, hacen perder a la tuberculina la capacidad de dar la reacción de Mantoux positiva, pero no efectuaron observaciones sobre la capacidad tóxica.

Las experiencias de Long y Seibert (18 y 19) sobre la composición química de la tuberculina comprueban que el principio activo es de naturaleza proteica.

Frente a opiniones tan discordantes, decidimos estudiar personalmente la posible separación de las dos sustancias.

Hemos usado para las experiencias una tuberculina preparada en la Sección Tuberculosis del Instituto, que llamamos Tuberculina M. A., obtenida en medio sintético de Dorset, en el mes de Diciembre de 1943, con las cepas y la técnica usadas en el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos de Norte América.

Las experiencias sobre digestión las efectuamos tratando la tuberculina con pepsina Parke Davis (facilitada gentilmente por el Dr. Gatti) a la concentración de 1 por 5.000, a pH 1,8, manteniéndola en la estufa a 38°C durante 20 horas bajo capa de toluol.

Las experiencias de diálisis las hicimos con sacos de celofán, contra agua corriente durante 5 días (para ensayar el residuo), y contra agua destilada durante el mismo tiempo (para ensayos del residuo y del dializado).

Además hemos investigado la acción de la pepsina sobre el P. P. D., con la misma técnica. Las experiencias de diálisis con el P. P. D. no las hemos efectuado puesto que ese producto ya ha sido sometido a la diálisis durante su obtención.

Como controles hemos usado tuberculina sin tratar y tuberculina sometida durante 20 horas a 38°C bajo capa de toluol, acidificada previamente a pH 1,8 y luego neutralizada.

Hemos preparado en total nueve muestras:

1. Tuberculina M. A. diluída al 1/10: sin tratar.
2. Tuberculina M. A. diluída al 1/10: se lleva a pH 1,8 con HCl al 20 %, y se mantiene 20 horas a 38°C bajo capa de toluol; luego se lleva a pH inicial (6,8 a 7,0) con hidróxido de sodio al 20 %: control de acidez .
3. Tuberculina M. A. diluída al 1/10: se trata como la anterior, pero con el agregado de pepsina Parke Davis a la concentración de 1/5.000: tuberculina digerida.
4. Tuberculina M. A. pura (10 ml.): se dializa por celofán contra agua corriente, durante 5 días, con cloroformo. Se recoje el residuo y se lleva a 100 ml.
5. Tuberculina M. A. pura (10 ml.): se dializa por celofán contra agua destilada (100 ml.), en heladera, y con cloroformo,

durante 5 días, renovando el agua destilada todos los días. Se recoje el residuo y se lleva a 100 ml.

6. Los 500 ml. del dializado de la experiencia anterior se concentran a baja presión y a 45-50°C. hasta llevar a 100 ml. Dializado.

7. Tuberculina P. P. D., conteniendo 1 miligramo de substancia por ml. Se lleva a pH 1,8 con HCl al 20 %, durante 20 horas a 38°C., bajo capa de toluol y luego a pH inicial con hidróxido de sodio al 20 %.

8. La misma con el agregado de pepsina al 1/5.000.

9. Tuberculina P. P. D.: conteniendo un miligramo de producto por ml., sin tratar.

Todas las muestras se conservaron cuatro días en heladera, con un poco de cloroformo, antes de efectuar los ensayos.

Experiencias sobre capacidad tóxica (Reacción sistémica). Con cada una de las muestras 1 a 6 inclusive inyectamos por vía subcutánea 3 cobayos sanos: 3 ml. de tuberculina diluída al décimo, equivalente a 0,30 ml. de tuberculina bruta.

Con las muestras 7, 8 y 9 inyectamos por la misma vía 1 ml., equivalente a 1 miligramo de P. P. D., a otros 9 cobayos: 3 por cada muestra. Todos los animales sobrevivieron sin presentar ningún trastorno.

Con cada una de las muestras inyectamos por la misma vía igual cantidad de tuberculina a cinco cobayos tuberculizados 2 a 3 meses antes con 1 miligramo de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* var. humana, virulento.

Los resultados obtenidos se pueden ver en el cuadro 1.

MUESTRA INYECTADA	Inoculados	Muertos dentro de las 24 hs.
1. Tub. M. A. sin tratar	5	5
2. Tub. acidificada y neutralizada	5	4
3. Tub. digerida	5	0
4. Tub. M. A. (residuo de diálisis)	5	4
5. Tub. M. A. (residuo de diálisis)	5	4
6. Tub. M. A. (dializado)	5	0
7. P. P. D. acidificado y neutralizado	5	5
8. P. P. D. digerido	5	0
9. P. P. D. sin tratar	5	5

Todos los cobayos muertos espontáneamente mostraron en la autopsia lesiones tuberculosas generalizadas y el cuadro de muerte tuberculínica aguda de Koch-Doenitz.

Los cobayos sobrevivientes inyectados con las muestras 2, 4 y 5 mostraron a las 24 horas un estado de decaimiento general bastante marcado que desapareció al día siguiente: los animales fueron sacrificados al cuarto día y la autopsia reveló la presencia de lesiones tuberculosas generalizadas sin otras alteraciones. Los otros co-

CUADRO N.º 2

Muestras							Muestras							
Cobayos	1	2	3	4	5	6	Cobayos	7	8	9				
244	++++	++++	+++	++++	-	-	+++	+++	+++	++++	-	-	+++	+++ +
233	Muere a las 24 horas-						202	+++	++++	-	-	+++	++++	
247	+++	+++	+++	+++	-	-	++++	++++	++	+++	-	-	+++	++++
252	+++	+++	+	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	205	Muere a las 21 horas.

bayos sobrevivientes fueron sacrificados a la semana de inoculados, observándose solamente lesiones de tuberculosis generalizada.

Queda demostrado, de acuerdo a nuestras experiencias, que la substancia contenida en la tuberculina y que produce la reacción sistémica pierde esa propiedad con la digestión por pepsina y no dializa por celofán.

EXPERIENCIAS SOBRE REACCIÓN DE PIEL

Se ensayaron 4 cobayos sanos, inyectándoles por vía intradérmica 0,10 ml. de tuberculina diluída al décimo: a cada uno de los animales las 6 primeras muestras; 3 de cada lado.

Otros 4 cobayos sanos fueron probados con las muestras 7, 8 y 9 inyectándoles 0,10 ml. que contenían 0,01 de milígramo de P. D.

Todos los cobayos reaccionaron negativamente.

De la misma manera se ensayaron, con cada muestra, 4 cobayos tuberculizados 3 meses antes, con 1 milígramo de *Mycobacterium tuberculosis* var. humana, virulento.

Las reacciones fueron observadas a las 24 y 48 horas, y los resultados se pueden ver en el cuadro 2.

De acuerdo a nuestra experiencia queda demostrado que la substancia contenida en la tuberculina y que provoca la reacción de piel en los cobayos tuberculosos no es dializable y no resiste la acción de la pepsina.

CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestras experiencias las dos propiedades que manifiesta la tuberculina en los animales tuberculosos (reacción sistémica y reacción de piel) no pueden ser separadas por la diálisis ni por la acción de la pepsina.

La fracción de tuberculina que produce los dos tipos de reacción no es dializable y es degradada por la pepsina.

BIBLIOGRAFÍA

1. DANIELOPOLU D. — Compt. rend. Soc. de biol., **64**: 334, 1909.
2. LOEWENSTEIN E. y PICK E. P. — Biochem. Ztschr., **31**: 142, 1911.
3. DORSET M., HENLEY R. R. y MOSKEY H. E. — J. Am. Vet. M. A., **71**: 487, 1927.
4. HENLEY R. R., DORSET M. y MOSKEY H. E., J. Am. Vet. M. A., **72**: 363, 1927.
5. LONG E. R. y SEIBERT F. B. — Am. Rev. Tuberc., **13**: 398, 1926.
6. MASCHMANN E. y KUESTER E. — Hoppe Seyler's Ztschr. physiol. Chem., **193**: 215, 1930.
7. MASCHMANN E. y KUESTER E. — Deutsche Med. Wchscr., **57**: 143, 1931.
8. KUESTER E. y MASCHMAN E. — Deutsche Med. Wchscr., **57**, 1497, 1931.
9. KUHLMANN H. — Berl. Tierart, Wchscr., **52**: 469, 1936.

10. MASCHMANN E. — Deutsche Med. Wchschr., **63**: 778, 1937.
11. TODA AADAO y MASAO MURATA. — Beitr. z. Kl. d. Tuberk., **93**: 64, 1939.
12. MUELLER HOWARD J. — J Exp., Med., **43**: 1 y 9, 1926.
13. FICHERA S. — Ztschr. f. Immunitätforsch. u. exper. Therap., **57**: 285, 1928.
14. PFEIFFER T. y PERSCH R. — Wien. Klin. Wchschr., **22**: 1149, 1909.
15. LONG E. R. — Am. Rev. Tuberc., **13**: 441, 1926.
16. SEIBERT F. — Am. Rev. Tuberc., **13**: 431, 1926.
17. SEIBERT F. y LONG E. R. — Am. Rev. Tuberc., **13**: 404, 1926.
18. SEIBERT F. — Am. Rev. Tuberc., **17**: 394 y 402, 1928.
19. LONG E. R. y SEIBERT F. — Am. Rev. Tuberc., **13**: 409 y 448, 1926.