

Pluralidad de antígenos contenidos en *B. anthracis*.

Por A. Sordelli y V. Deulofeu

En el estudio de las propiedades de los sueros anticarbunclosos obtenidos por inmunización por vía venosa, se pudo comprobar que los anticuerpos precipitantes, aglutinantes y protectores están contenidos en las proteínas que precipitan por dilución con agua, mientras que los anticuerpos de fijación del complemento se hallan en la parte soluble.

Continuación de estas investigaciones fué el estudio de la naturaleza del antígeno precipitinógeno y del antígeno fijador del complemento, que constituye el tema de esta comunicación.

I

Antígeno precipitinógeno, su obtención y sus propiedades.

Sobre la obtención y propiedades de estas sustancias han aparecido los trabajos de Schockaert ⁽¹⁾ y de Tomcsik ⁽²⁾.

El *B. anthracis* empleado en estas experiencias fué una cepa de vacuna Pasteur I existente en el Instituto Bacteriológico del D. N. de Hig.

Se cultivaron 20 frascos de agar suero con *B. anthracis* y después de 24 horas de estufa se suspendieron bien los bacilos

Recibido para publicarse, octubre 1930.

(1) J. Schockaert. C. R. S. Biol. T. 99, pág. 1242, 1929.

(2) J. Tomcsik. Zeits. J. Hyg. u. Infektions Krankheiten, 111, 119, 1930.

en un litro de agua destilada. Se calentó todo en estufa de 100° durante 30' y se centrifugó el líquido para separar bien los bacilos. El líquido resultante se trató con 1.5 de alcohol a 95° con 22 gramos de acetato de Na., alcalinizando después todo con hidrato de sodio, hasta que se produjera una flocculación. Se separó así un precipitado que después de dejado reposar 24 horas más se decantó y el resto se separó por centrifugación. El residuo se suspendió a 650 cm.³ de agua dando una solución bastante turbia que se aclaró lo más posible haciéndola pasar varias veces por centrífuga Sharples. El líquido se trató nuevamente con alcohol y acetato de sodio, repitiéndose esta serie de operaciones hasta que una solución del precipitado no diera más reacción del biuret. Se requirieron para ello 6 precipitaciones. En este momento el precipitado no da la reacción de Millon, ni la de Pauly. Da reacción intensa de hidratos de carbono e hidrolizada reduce sales de cobre.

La substancia así purificada y secada al vacío fué empleada para las siguientes experiencias:

Precipitación: Con suero anticarbuncloso obtenido por inmunización intravenosa precipita hasta la concentración de uno por un millón. La técnica usada es la corriente, de superposición en dos capas.

Fijación del complemento: Los ensayos de fijación de complemento se realizaron todos con la fracción soluble en agua destilada de un suero obtenido por inmunización intravenosa de acuerdo con la técnica comunicada por uno de nosotros.

ENSAYO 1°. Poder fijador del antígeno purificado.

Fracción soluble de suero 395 en la dosis de 0.02 cm.³.

Complemento diluído al décimo 0.2 cm.³.

A. suspensión de *B. anthracis* de 5000 millones por cm.³.

B. solución de antígeno purificado conteniendo un milígramo por cm.³.

Los tubos de la reacción contienen: 0.2 cm.³ de la fracción soluble en agua destilada, del suero anticarbuncloso 935 que corresponden a 0.02 cm.³ del suero original, 0.2 cm.³ de complemento diluído al décimo y dosis variables de antígeno. Los tubos testigos tienen en sustitución del suero específico, solución fisiológica.

Dosis de antígeno en cm. ³	A <i>B. anthracis</i> + suero específico	<i>B. anthracis</i> (testigo)	B Antígeno purificado + suero específico.	Antígeno purificado (testigo)
0.5	O	¼ H	¼ H	¼ H
0.2	O	H	CH	H
0.1	O	H	H	H
0.05	¼ H	H	H	H
0.02	H	H	H	H
0.01	H	H	H	H

El antígeno purificado no tiene propiedades de antígeno fijador del complemento. Su poder anticomplementario no permite su uso en dosis mayores de 0.5 mgs.

Este antígeno no da reacción de precipitación con el líquido sobrenadante utilizado en esta experiencia. Es en cambio, como lo dijéramos, muy sensible a la precipitación con suero total y con la fracción insoluble en agua.

ENSAYO 2°. Dados los resultados del experimento anterior tratamos de determinar si se podía extraer de *B. anthracis* una substancia capaz de fijar el complemento con el suero específico. Se realizaron dos series de ensayos, una de ellas extrayendo los bacilos en frío y otra por extracción con solución fisiológica a 100°.

A: Extracto frío en solución fisiológica de *B. anthracis*.

B: *B. anthracis* extraídos en frío por solución fisiológica.

C: Mezcla de A y B.

D: Extracto a 100° en solución fisiológica de *B. anthracis*.

E: *B. anthracis* extraídos a 100° por solución fisiológica.

F: Mezcla de D y E.

G: Antígeno purificado.

Se determinó previamente la dosis de complemento que en presencia de cada uno de los antígenos producía la hemólisis total; en la reacción se usa 0.2 cm.³ de complemento al décimo.

El suero 935 se fracciona por agua destilada y de cada una de las dos fracciones se usa una cantidad correspondiente a 0.02 cm.³ del suero original. Se emplea esta misma dosis de suero total.

PROTOCOLO

	Dosis de anti- geno en cm. ³	Antígeno						
		A	B	Dosis doble C	D	E	Dosis doble F	G
Suero total 0.02 cm. ³	0.1	H	H	H	H	H	H	H
	0.05	H	H	H	H	H	H	H
	0.02	H	H	H	H	H	H	H
Fracción so- luble en agua 0.02 cm. ³	0.1	H	H	H	H	H	H	H
	0.05	H	H	H	H	H	H	H
	0.02	H	H	H	H	H	H	H
Fracción in- soluble en 0.02 cm. ³	0.1	O	O	O	H	H	O	H
	0.05	H	CH	O	H	H	O	H
	0.02	$\frac{2}{3}$ H	H	H	CH	H	H	H

Se ve, pues, que la substancia que posee la propiedad de fijar el complemento es soluble en solución fisiológica y relativamente termoestable. Los bacilos extraídos en caliente no fijan el complemento o lo hacen muy débilmente. Estas características se han confirmado en experiencias posteriores.

ENSAYO 3°. En este ensayo fué investigada la influencia que tiene la adición de suero al medio de cultivo donde crece el *B. anthracis* usado para las experiencias.

Antígenos obtenidos de *B. anthracis* cultivado en agar suero.

A. Suspensión de *B. anthracis* extraídos 15' a 100° con agua destilada.

B. Suspensión de *B. anthracis* extraídos 15' a 100° con solución fisiológica.

C. Extracto A.

D. Extracto B.

Antígenos obtenidos de *B. anthracis* cultivados en agar simple.

E. Suspensión de *B. anthracis* extraídos 15' a 100° con agua destilada.

F. Suspensión de *B. anthracis* extraídos 15' a 100° en solución fisiológica.

G. Extracto E.

H. Extracto F.

En esta experiencia se emplea parte del suero 935 soluble en agua CO₂ en la dosis de 0.02 cm.³.

Dosis de antígeno en cm. ³	Antígeno							
	A	B	C	D	E	F	G	H
0.1	1/2 H	1/2 H	O	O	O	pH	3/4 H	O
0.05	CH	CH	1/4 H	1/4 H	3/4 H	CH	CH	H
0.02	H	H	H	3/4 H	H	H	H	H

Es evidente que tanto la solución fisiológica cuanto el agua destilada tienen la propiedad de disolver las sustancias fijadoras del complemento (extractos C. D. G. y H.). Parece que la solubilidad del antígeno es mayor en los bacilos cultivados en agar suero que en agar simple.

La solubilidad del antígeno fijador, ya vista en experiencias publicadas por uno de nosotros, tiene como aparente contradicción la ausencia de poder fijador del antígeno soluble purificado por precipitación alcohólica. La suposición que primero se nos ocurriera y que resultara luego comprobada, fué la de que se tratara de dos antígenos, uno estable a los tratamientos de la purificación, y otro, el fijador, inestable.

Las experiencias siguientes prueban la existencia de esas dos sustancias.

Acción de la temperatura, pH y de la desecación, sobre el extracto.

Complemento 0.2 cm.³ de dilución 1/10.

Suero 0.2 cm.³ de la parte sobrenadante diluída al 1/10.

Antígeno *B. anthracis* de 10.000 millones por cm.³ (Cultivados en agar suero).

A. Extracto obtenido por calentamiento a 100° en sol. fisiológica durante pocos instantes.

- B. Extracto A calentado a 100° durante 1 hora, (pH-7).
- C. Extracto A desecado a 37° y disuelto luego en igual volumen.
- D. Extracto A calentado 10' a 100° pH 3,3.
- E. Extracto A, calentado 10' a 100° pH 5.

PROTOCOLO

Dosis	Extractos				
	A	B	C	D	E
0.1	O	O	O	O	pH
0.05	pH	½H	pH	pH	H
0.02	¼H	H	H	½H	H

De esta experiencia se deduce: 1º, la coctoestabilidad en solución neutra y alcalina; 2º, la labilidad por calentamiento a pH 5; 3º, la resistencia del antígeno a la desecación. Es interesante hacer notar que en todos los casos, salvo el del calentamiento en medio ácido, no fué visible ningún enturbiamiento.

Esta observación tiene su importancia, pues es evidente, de acuerdo con la experiencia siguiente, que cualquier reactivo que coagule las proteínas hace desaparecer en parte o totalmente el poder de fijar complemento que tienen los extractos de *B. anthracis*.

ENSAYO 4º. En este ensayo se investigó la alteración del antígeno por acción de algunas substancias precipitantes de las proteínas.

Antígenos.

A. Extractos de *B. anthracis* en solución fisiológica, (en frío).

B. Un volumen de extracto A se precipita con 9 volúmenes de alcohol absoluto, agregando una pequeña cantidad de solución de hidrato de sodio hasta inmediata floculación. A las 24 horas se centrifuga y el precipitado se disuelve en solución fisiológica.

C. El extracto A es tratado de igual manera que en B. En lugar de la centrifugación se evapora el líquido con el residuo y se disuelve en solución fisiológica.

D. Igual al anterior, sin añadido de alcali.

E. El alcohol sobrenadante del extracto B se evapora, se neutraliza y se disuelve en solución fisiológica.

F. A un volumen de extracto de *B. anthracis* se añaden 9 volúmenes de acetona y al cabo de una hora se centrifuga el precipitado que se suspende en sol. fisiológica.

G. La acetona del experimento anterior se evapora a sequedad y el residuo se suspende en solución fisiológica.

H. Se añaden como en el experimento F, 9 volúmenes de acetona a un volumen del extracto. Después de una hora se evapora la acetona y el residuo se suspende en solución fisiológica.

I. Al extracto de bacilos se agrega sulfato de amonio a saturación; el precipitado se disuelve en solución fisiológica.

Todos estos líquidos contienen las sustancias de una misma cantidad de *B. anthracis* por unidad de volumen. Sus actividades relativas expresan, pues, el valor antigénico de cada fracción.

Dosis de antígeno	Antígeno								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0.1	O	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{2}{1}$ H	$\frac{1}{2}$ H	H	CH	CH	$\frac{1}{2}$ H	O
0.05	CH	CH	H	CH	H	CH	CH	CH	CH
0.02	CH	H	H	H	H	CH	CH	CH	CH

El protocolo anterior permite deducir que el alcohol y la acetona reducen considerablemente la actividad antigénica. Este comportamiento explicaría la desaparición de las propiedades antigénicas por repetidas precipitaciones por alcohol. La solución del precipitado obtenido por sulfato de amonio es completamente clara, mientras las de los antígenos preparados por acción del alcohol y la acetona tienen una marcada turbidez. Estos líquidos turbios que contienen poco antígeno fijador conservan íntegramente su actividad como precipitinógeno. Por el contrario el precipitado obtenido con el sulfato de amonio, que conserva las propiedades del extracto original como antígeno fijador no tiene ninguna actividad como precipitinógeno.

RESUMEN

Puede extraerse del *B. anthracis* cultivado en agar suero, con agua o con solución fisiológica, mejor en caliente que en frío, una substancia que tiene la propiedad de fijar el complemento en presencia de la fracción soluble en agua y CO₂ del suero anticarbuncoso. En estos extractos se encuentra, además, una substancia de naturaleza hidrocarbonada que tiene los caracteres del antígeno precipitinógeno.

Ambas substancias son relativamente termoestables en medio neutro y en medio alcalino. La substancia fijadora se destruye por el calor en medio ácido.

El alcohol y la acetona tienen la propiedad de precipitar ambas substancias. La substancia precipitinógena no se desnaturaliza, en cambio, la que posee las propiedades fijadoras se altera profundamente y termina por desnaturalizarse y perder definitivamente su capacidad antigénica.