

Sobre "Hemoglobinuria de los bovinos".

La hemotoxina producida por *Bacillus sp.*

A. Sordelli, E. Suárez y J. Ferrari

(TERCERA MEMORIA)

La acción hemotóxica de los filtrados de *Bacillus sp.* es siempre manifiesta, como también la de los macerados y extractos de los músculos donde se encuentra la lesión de la enfermedad reproducida experimentalmente.

Como uno de los principales signos de la enfermedad es la hemoglobinuria, debida muy verosímilmente a la destrucción de los glóbulos por la hemotoxina, juzgamos de interés apreciar las propiedades hemotóxicas de la toxina de *B. sp.* y estudiar el mecanismo de su acción.

Fué estudiada la toxina seca N° 1, que ha servido para investigar la acción tóxica.

Sensibilidad de los glóbulos de distintas especies a la hemotoxina

La técnica usada para investigar la acción hemotóxica ha sido la siguiente: glóbulos lavados tres veces, y suspendidos luego en proporción de 10 cm.³ de sangre original para cada 100 cm.³ de volumen. Se usan 0.5 cm.³ de esta emulsión al 10 % a los que se agrega 0.5 cm.³ de solución hemotóxica. La mezcla permanece 30' a 37° y luego en heladera a 8° - 9° hasta la sedimentación (5 a 9 horas).

Pueden dividirse los glóbulos en dos grupos, uno, de los sensibles a la hemotoxina y que presentan sólo el fenómeno de la hemolisis y otros que a más de la hemolisis presentan el fenómeno de la hemaglutinación.

Al primer grupo pertenecen los glóbulos de oveja, vaca, laucha, perro, caballo, paloma y cabra. Al segundo los de conejo, cobaya, rata y hombre.

PRIMER GRUPO

Glóbulos de

Dosis de hemo- toxina mgs.	Oveja	Bovino	Laucha	Perro	Caballo	Paloma	Cabra
0.5	H	H	H	CH	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H
0.2	H	H	H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H	$\frac{1}{4}$ H
0.1	H	H	H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	pH	pH
0.05	H	H	CH	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H	O	O
0.02	H	CH	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H	pH	O	O
0.01	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H	pH	O	O	O

SEGUNDO GRUPO

Glóbulos de

Dosis de hemotoxina mgs.	Conejo		Cobaya		Rata		Humano	
	hemolisis	aglutinación	hemolisis	aglutinación	hemolisis	aglutinación	hemolisis	aglutinación
0.5	CH	+	$\frac{1}{4}$ H	+++	$\frac{3}{4}$ H	+	pH	+
0.2	CH	++	$\frac{3}{4}$ H	++	$\frac{3}{4}$ H	+	$\frac{1}{4}$ H	+
0.1	$\frac{3}{4}$ H	++	H $\frac{1}{4}$	++	CH	++	$\frac{1}{2}$ H	+
0.05	$\frac{3}{4}$ H	+++	$\frac{1}{4}$ H	+++	CH	++	$\frac{1}{2}$ H	+
0.02	$\frac{3}{4}$ H	+++	pH	+	$\frac{1}{2}$ H	++++	$\frac{1}{2}$ H	+

Con los glóbulos del primer grupo se observa una hemólisis tanto más intensa cuanto mayor es la dosis de hemotoxina. Con el segundo el fenómeno de la aglutinación perturba sin duda la salida de la hemoglobina y hace que la hemólisis presente un máximo con dosis intermedia de hemotoxina para los glóbulos de cobaya, rata y de hombre.

En el primer grupo el orden de sensibilidad creciente es cabra, paloma, caballo, perro, laucha, bovino, oveja, y en el segundo hombre, rata, cobaya, conejo.

Los glóbulos de *Bufo arenarum* (sapo común) y de *Xenodon Merremii* son apenas sensibles a la hemotoxina. Sus emulsiones acusan, sin embargo, una modificación de su aspecto que se puede interpretar como por una aglutinación incipiente. Las emulsiones de glóbulos de estas especies presentan un aspecto moaré que desaparece por acción de la hemotoxina.

Fijación de la hemotoxina sobre los estromas.

La fijación de la hemotoxina por los glóbulos rojos sensibles suele ser atribuída a una propiedad de los estromas, a semejanza de la fijación de las hemolisinas.

En el caso presente hemos investigado si los estromas y las sustancias solubles en alcohol-éter tiene capacidad fijadora.

Se preparan estromas por hemólisis de glóbulos de bovino, filtración por algodón para detener los glóbulos blancos, precipitación por centrifugación y lavado. Se hace con los estromas una emulsión que equivale a 1 cm.³ de sangre original.

Una parte de esta emulsión se seca en vacío, y una porción se suspende nuevamente en solución fisiológica. El resto se extrae con alcohol y éter. El residuo de la extracción se libra del alcohol y éter, y se suspende en solución fisiológica. El extracto alcohólico etéreo de los estromas se evapora y suspende en solución fisiológica.

Quedan así preparadas las siguientes emulsiones en solución fisiológica que contiene las diversas fracciones de glóbulos rojos de bovino; todas tienen una concentración equivalente a la de la sangre original.

- 1 Glóbulos rojos de bovino lavados en solución fisiológica.
- 2 Extracto alcohólico etéreo de glóbulos de bovino evaporado y suspendido en solución fisiológica.
- 3 Estromas de glóbulos de bovino.

- 4 Estromas secos y luego suspendidos en solución fisiológica.
- 5 Estromas secos extraídos en alcohol y éter y luego suspendidos en solución fisiológica.
- 6 Extracto de estromas en alcohol-éter, evaporado y suspendido en solución fisiológica.
- 7 Estromas hervidos 10'.
- 8 Solución fisiológica.

Con estas emulsiones se preparan las siguientes mezclas:

2 cm. ³ (1) + 2 cm. ³ sol. fisiológica con 4 miligramos de toxina seca								
2 " (2) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (3) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (4) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (5) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (6) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (7) + 2 " " " " " " " " " "								
2 " (8) + 2 " " " " " " " " " "								

La mezcla (1) se pone a 0°, las restantes a 37° durante 4 horas; al cabo de este tiempo se centrifugan y en el líquido sobrenadante se mide el poder hemotóxico.

Vol. de líquido sobrenadante. (= mgs. de toxina).	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7	Mezcla 8 Testigo
0.5	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
0.2	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
0.1	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
0.05	$\frac{3}{4}$ H	CH	$\frac{1}{2}$ H	CH	CH	CH	CH	CH
0.02	pH	$\frac{1}{4}$ H	$\frac{1}{4}$ H	pH	$\frac{1}{2}$ H	pH	pH	$\frac{3}{4}$ H
0.01	O	pH	pH	O	$\frac{1}{4}$ H	O	O	$\frac{1}{2}$ H

Los glóbulos nativos, Mezcla 1, son lavados en solución fisiológica y luego suspendidos en solución fisiológica de tal manera de hacer una emulsión correspondiente al 5 % de sangre.

Esta suspensión de glóbulos de la mezcla 1 se coloca a 8° a 22° y a 37° media hora y luego a 8°. Los resultados son:

8°	1/2 H
22°	1/4 H
37° - 8°	3/4 H

Del examen de este protocolo se deduce *primero*: que los glóbulos nativos en frío fijan hemotoxina en proporción apenas suficiente para su hemolisis; *segundo*: que los estromas hervidos como también los estromas secados en vacío y luego suspendidos en solución fisiológica (3) (4) (7) fija hemotoxina en forma semejante a los glóbulos nativos; *tercero*: que el extracto alcohólico etéreo de glóbulos y de estromas (2) y (6) fijan la hemotoxina; *cuarto*: que los estromas extraídos no conservan la propiedad de fijar la hemotoxina. En resumen, puede decirse que los estromas fijan la hemotoxina por las sustancias solubles en alcohol-éter que contienen.

Atenuación por el formol.

Una solución de toxina que contiene un mg. por cm.³ se somete durante 24 horas a la acción del formol a 5 o/oo a las temperaturas de 5° y 37°. Usando como controles la misma toxina puesta bajo toluol a 5° y 37°.

La determinación de la variación de acción hemotóxica se hace por la técnica habitual tomando como tipo de hemolisis la de una solución de toxina conservada a 5° sin adición alguna y además de la misma toxina adicionada de toluol y de formol en el momento del ensayo.

La lectura se hace después de 40' de incubación a 37° y 12 horas en heladera.

La toxina se conserva sin alteración con toluol a 37°. El formol reduce su actividad ya a 5°, y a 37° la anula completamente en 24 horas.

Toxina Mgs.	Toxina 5°		Toxina 5° toluol		Toxina 5° formol		Toluol 5°		Formol 5°		Toluol 37°		Formol 37°	
	vaca	conejo	vaca	conejo	vaca	conejo	vaca	conejo	vaca	conejo	vaca	conejo	vaca	conejo
0.5	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	O	O
0.2	H	CH	H	CH	H	CH	H	CH	H	CH	H	CH	O	O
0.1	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	$\frac{3}{4}$ H	CH	CH	CH	O	O
0.05	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	O	O

ACCIÓN DEL CALOR SOBRE LA TOXINA

Atenuación por calentamiento durante: 5° a 50°, 55°, 60°, 65° y 70° de una solución de toxina en solución fisiológica

Mgs. de Toxina	Testigo		50°		55°		60°		65°		70°	
	Bovino	Conejo	Bovino	Conejo	Bovino	Conejo	Bovino	Conejo	Bovino	Conejo	Bovino	Conejo
0.5	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH	pH	$\frac{1}{4}$ H	O	O
0.2	CH	CH	CH	CH	CH	CH	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	O	O	O	O
0.1	CH	$\frac{3}{4}$ H	CH	$\frac{3}{4}$ H	CH	$\frac{3}{4}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	O	O	O	O
0.05	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{2}$ H	$\frac{1}{4}$ H	O	O	O	O
0.02	pH	pH	$\frac{1}{4}$ H	$\frac{1}{4}$ H	$\frac{1}{4}$ H	pH	pH	pH	O	O	O	O
0.01	O	O	O	O	pH	O	O	O	O	O	O	O

Influencia de la temperatura sobre la acción hemolítica.

En una primera serie de experimentos se investigó la influencia de la temperatura entre límites extremos y de manera cualitativa.

En una segunda se estrecharon los límites y se investigó cuantitativamente. Los resultados están en los protocolos que siguen.

1ª experiencia.

Se hace actuar una solución de hemotoxina sobre glóbulos de bovino y conejo a distintas temperaturas, haciendo observaciones a intervalos de tiempo. La experiencia termina colocando a 9° todos los tubos y leyendo los resultados a las 6 horas.

PRIMER TIEMPO 1 hora 30' a diferentes temperaturas				SEGUNDO TIEMPO 6 horas a 9°	
Temperatura	Tiempo de aparición de hemolisis	Dosis mínima que produce hemolisis 1 h. 30' (mgs.)	Grados de hemolisis con la dosis límite	Dosis mínima que produce hemolisis (en mgs.)	Grado de hemolisis con la dosis límite

Globulos de bovino

9°	—	—	0	0.2	pH
22°	90'	0.2	¼ H	0.05	¼ H
37°	30'	0.05	¼ H	0.01	½ H
42°	20'	0.02	¼ H	—	—

Glóbulos de conejo

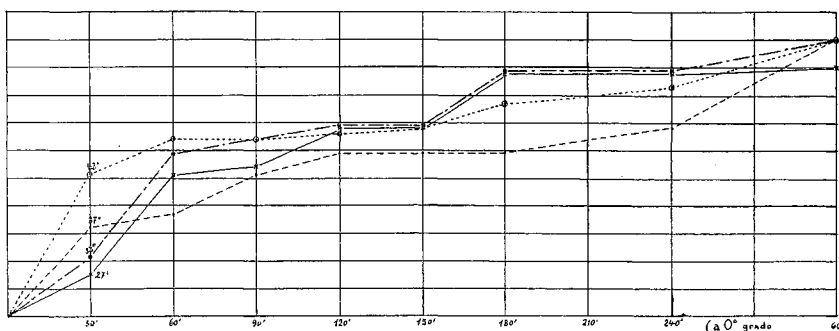
9°	90'	0.2	¼ H	0.2	¼ H
22°	30'	0.1	½ H	0.05	¼ H
37°	20'	0.02	½ H	0.01	½ H
42°	20'	0.01	¾ H	—	—

De estos resultados se deduce una acción escasa sobre los hematíes a temperatura baja (9°). La actividad se duplica en-

tre 9° y 22° (glóbulos de conejo) y quintuplica entre 22° y 37°; un crecimiento de orden semejante hay entre 37° y 42°. Un hecho curioso es la prosecución de la hemolisis a la temperatura de 9°, una vez que los glóbulos han sufrido la acción de la hemotoxina a temperatura más elevada. Este fenómeno es mucho más intenso en los glóbulos de bovino que con los de conejo y fué observado regularmente en todos los ensayos realizados en el curso de esta investigación.

2ª experiencia.

Se mezclan glóbulos con una solución de veneno en partes iguales. A cada centímetro cúbico de glóbulos al 10 % corresponde un milígramo de hemotoxina. Se divide esta mezcla en cuatro porciones que se colocan a 27°, 32°, 37° y 42°. De cada una de ellas se toman muestras en la que se determina el grado de hemolisis por colorimetría. Los resultados están expresados en los gráficos adjuntos que revelan: 1°, un comportamiento excepcional para los glóbulos mantenidos a 37°, a cuya temperatura la hemolisis marcha con más lentitud; 2°, una sensibilidad grande de los glóbulos en más o menos la mitad de ellos, tanto a 27° como a 32° y a 42°. El fenómeno es menos evidente para 37°; 3°, aparece luego un período de incubación seguido de una hemolisis intensa después de pasados 90' más; 4°, a la temperatura de 0° los glóbulos ya alterados por el veneno, muestran una sensibilidad extraordinaria, que es más evidente para la temperatura de 37°. (Ver la curva adjunta).



Influencia de la temperatura sobre la acción hemolítica

Temperatura	Grados de hemolisis a diferentes tiempos							Hemolisis después de permanecer 60' a 0°
	30'	60'	90'	120'	150'	180'	240'	
27°	15	51	64	68	68	88	88	100
32°	21	59	64	68	68	88	88	110 (H total)
37°	32	37	51	59	59	59	68	110 (H total)
42°	51	64	64	66	68	77	83	110 (H total)

Hemotoxina del macerado de músculo.

El signo más característico de la enfermedad estudiada, la hemoglobinuria, puede ser explicada perfectamente por la existencia en la toxina de *Bacillus sp.* de una hemotoxina muy activa. Más justificación tiene la hipótesis de la existencia de una acción hemotóxica como causa de la hemoglobinuria, si se tiene presente que en el macerado de la masa muscular afectada se encuentra una hemotoxina.

La masa muscular de la región inoculada se macera en solución fisiológica (1 a 3) y con el líquido se hace el siguiente ensayo para determinar la actividad de la hemotoxina.

Dosis de cm. ³	Glóbulos de bovino	Globulos de conejo	
		hemolisis	aglutinación
0.5	H	H	+
0.2	C H	H	+
0.1	$\frac{3}{4}$ H	H	++
0.05	$\frac{1}{4}$ H	$\frac{3}{4}$ H	+++
0.02	O	$\frac{1}{2}$ H	+++
0.01	O	$\frac{1}{4}$ H	+++++