

Folia Biologica

Publicación del personal técnico del Instituto Bacteriológico
del Departamento Nacional de Higiene

Dirección y Administración: VELEZ SANSFIELD 563

Folia Biol.

Buenos Aires, febrero, marzo y abril 1932

N^{os} 11, 12 y 13

TRABAJOS ORIGINALES

Actividad antigénica *in vivo* del *B. anthracis* y sus fracciones, I. Anticuerpos de fijación

Por A. SORDELLI, V. DEULOFEU y J. FERRARI

En una comunicación anterior¹ nos hemos ocupado de las propiedades de las sustancias antigénicas de *B. anthracis*, habiendo demostrado *in vitro* la diferente naturaleza del *precipitinógeno* y del *antígeno de fijación*.

Prosiguiendo dicho estudio hemos investigado la génesis de los anticuerpos fijadores, por inmunización con el *B. anthracis* y diversas fracciones de sus extractos.

Como antígeno hemos usado suspensiones de *B. anthracis*, avirulento, cultivado en agar-suero, y distintas fracciones del extracto de las mismas, preparadas de acuerdo a la siguiente técnica:

Los *B. anthracis* provenientes del cultivo, se emulsionan en solución fisiológica (\pm 300.000 millones por c.³) y se lavan dos veces con dicha solución. El residuo (designado fracción *A*) está constituido por bacilos lavados. El líquido sobrenadante de la primera emulsión en solución fisiológica (designado fracción *B*), contiene diversas sustancias extractivas del *B. anthracis*. De la fracción *B* se obtienen dos fracciones más, de naturaleza diferente: una, por precipitación con SO_4H_2 a pH. 3.8-4., y otra por precipitación con alcohol acetato de sodio. La primera de éstas (designada fracción *C*) parece estar constituida por sustancias de naturaleza nucleoproteica, impurificadas por sustancias absorbidas, y la segunda (designada fracción *D*) contiene una sustancia con caracteres de un hidrato de carbono complejo. La purificación de la fracción *C* se hace por disolución en álcali y precipitación con SO_4H_2 a pH. 3.8-4.; la de la fracción *D* por eliminación de las sustancias precipitables a pH. 3.8-4.

La inmunización la realizamos inyectando caballos por vía venosa, empleando como antígenos los cuatro ya someramente descritos y que son:

A = *B. anthracis* lavados.

B = Líquido sobrenadante de *B. anthracis*.

C = Nucleoproteínas de *B. anthracis*.

D = Sustancia específica soluble de *B. anthracis*, de naturaleza hidrocarbonada.

1. A. SORDELLI y V. DEULOFEU. *Pluralidad de antígenos contenidos en B. anthracis*. Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene, vol. V, N^o 7, págs. 778-785. Buenos Aires, julio 1930.

La investigación de anticuerpos de fijación del complemento la efectuamos, después de tres y medio meses de inmunización, siguiendo la técnica descrita por SORDELLI y sus colaboradores².

Para realizar la reacción de fijación empleamos la parte de los sueros soluble en agua destilada saturada de ácido carbónico. Como antígenos utilizamos una emulsión de *B. anthracis* cultivados en caldo y otra de bacilos crecidos en agar-suero. Los resultados están expresados en el cuadro siguiente:

Suero preparado con:	Límite de fijación del complemento en c. ⁸	
	<i>B. anthracis</i> (agar - suero)	<i>B. anthracis</i> (caldo)
Antígeno A	< 0.001	0.002
„ B	< 0.001	0.002
„ C	< 0.01	0.005
„ D	> 0.02	> 0.02

Estos datos demuestran que las tres primeras fracciones (A, B, C) tienen actividad antigénica y que la cuarta fracción (D), constituida por la substancia específica soluble de los *B. anthracis*, carece de actividad.

RESUMEN: Los anticuerpos de fijación del complemento para el *B. anthracis*, pueden considerarse engendrados por substancias que parecen corresponden al tipo de las nucleoproteínas o por proteínas adsorbidas en el precipitado obtenido por acidificación de extractos de dicho bacilo.

Precipitinas para el agar. (Tercera comunicación)

Por A. SORDELLI y E. MAYER

Las precipitinas para el agar pueden ser engendradas por inmunización venosa de caballos con *B. anthracis* crecidos en agar-suero*. La virulencia de la cepa no tiene influencia. La inmunización por vía subcutánea, empleando los mismos antígenos, sólo permite obtener sueros de muy débil actividad precipitinógena.

También se obtiene suero precipitante muy activo con *E. typhi*, cultivada sobre agar simple e inyectada por vía venosa.

El suero antimeningocócico, obtenido por inyección intravenosa de *Neisseria intracellularis* cultivada en agar, contiene ocasionalmente precipitinas para el agar, siendo siempre pequeña su actividad precipitinógena.

En el cuadro siguiente se pueden observar los resultados mencionados. También se ve que la actividad precipitante para el agar no guarda en todos los sueros anticarbuncosos una misma relación con la actividad precipitante para el *B. anthracis*.

2. A. SORDELLI, P. BELTRAMI y C. HARISPE. *Las sensibilizatrices del suero anticarbuncoso*. Rev. del Inst. Bact. del D. N. de H., vol. V, N° 3, págs. 376-398. Buenos Aires, julio 1928.

* Para la preparación del antígeno y para el método de inmunización ver: A. SORDELLI, P. BELTRAMI, C. HARISPE y C. FRANCESCHI. *Las precipitinas del suero carbuncoso*. Rev. del Inst. Bact. del D. N. de H., vol. V, N° 3, págs. 377-378. Buenos Aires, julio 1928.

	SUERO ANTICARBUNCLOSO											SUERO ANTIMENINGOCOCCICO								Suero Antitífico	
	Inmunización por vía venosa						Inmunización por vía subcutánea					Inmunización por vía venosa								Inmunización por vía venosa	
	Cepa virulenta				Cepa avirulenta		Cepa virulenta			Cepa avirulenta											
	933	560	541	379	935	938	937	391	387	845	753	112	118	120	346	841	844	852	974	975	857
Precipitinas para																					
<i>B. anthracis</i>	+	+	++	++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar	+	+++	+++	++	+++++	+++++	++	+	+	+	+	0	0	+	+++	0	0	++	0		+++++

	SERUM ANTICARBONNEUX											SERUM ANTIMENINGOCOCCIQUE								Sérum Antityphique	
	Immunisation par voie endoveineuse						Immunisation par voie souscutanée					Immunisation par voie veineuse								Immunisation par voie veineuse	
	Souche virulente				Souche avirul.		Souche virulente			Souche avir.											
	933	560	541	379	935	938	937	391	387	845	753	112	118	120	346	841	844	852	974	975	857
Precipitines pour																					
<i>B. anthracis</i>	+	+	++	++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar	+	+++	++++	++	+++++	+++++	++	±	+	+	0	0	+	+++	0	0	++	0	0		+++++

El suero antineumocócico preparado por inyección intravenosa de *Diplococcus pneumoniae* (tipo I) cultivados en caldo, no contiene precipitinas para el agar.

El suero anticarbuncloso obtenido por inyección intravenosa de *B. anthracis* cultivado en caldo o en caldo-suero, no produce precipitación en presencia de agar. El mismo resultado se obtiene con los sueros antitóxicos (difteria, tétano, etc.)

Precipitines pour l'agar. (Troisième communication)

Par A. SORDELLI et E. MAYER

Les précipitines pour l'agar ont été obtenues par immunisation veineuse du cheval¹, avec des antigènes constitués par l'émulsion de bactéries cultivées sur l'agar, c'est à dire, par des antigènes complexes (bactéries-agar).

Avec le *B. anthracis* la plupart des chevaux immunisés de cette façon, donnent un sérum précipitant pour l'agar très actif. Si l'on compare l'activité antigénique des *B. anthracis* virulents et non virulents on ne trouve pas de différence, toujours du point de vue de la production des précipitines pour l'agar.

La voie sous-cutanée ne donne que des sérums très peu actifs; les mêmes sérums ne contiennent pas des précipitines pour le *B. anthracis*. (Voir tableau ci-joint page 47).

De même on a pu préparer le sérum précipitant pour l'agar avec le *E. typhi*, cultivé sur l'agar et injecté par voie veineuse.

Nous avons aussi démontré que la *Neisseria intracellularis*, cultivée sur agar, ne constitue pas un précipitinogène très actif, et que seulement deux chevaux, entre neuf immunisés, avaient dans son sang des précipitines pour l'agar.

Les antigènes qui ne contiennent pas d'agar, ne sont pas capables de produire des sérums précipitants pour l'agar. Cette constatation a été faite par immunisation veineuse du cheval avec *B. anthracis* et *Diplococcus pneumoniae* cultivés dans bouillon. Dans le sérum anticharbonneux ainsi préparé on trouve des précipitines pour le *B. anthracis* et dans le sérum antineumococcique, des précipitines pour le *Diplococcus pneumoniae*.

Les sérums antitoxiques (antidiphthérique, tétanique, etc.) préparés par injection sous-cutanée de toxine ne contiennent pas des précipitines pour l'agar.

Activité antigénique *in vivo* du *B. anthracis* et de ses fractions.

I. Anticorps de fixation

Par A. SORDELLI, V. DEULOFEU et J. FERRARI

Dans une communication antérieure² nous sommes occupés des propriétés des substances antigéniques du *B. anthracis* et nous avons démontré *in vitro* la nature différente du précipitinogène et de l'antigène de fixation.

Après, nous avons cherché de connaître la genèse des anticorps fixateurs par immunisation avec le *B. anthracis* et les fractions de ses extraits.

1. Pour la préparation de l'antigène et la méthode d'immunisation voir: A. SORDELLI, P. BELTRAMI, C. HARISPE y C. FRANCESCHI. *Las precipitinas del suero anticarbuncloso*. Rev. del Inst. Bact. del D. N. de H., vol. N° 3, págs. 376-398. Buenos Aires, julio 1928.

2. A. SORDELLI y V. DEULOFEU. *Pluralidad de los antígenos contenidos en B. anthracis*. Rev. del Inst. Bact. del D. N. de H., vol. V, N° 7, págs. 778-785. Buenos Aires, julio 1930.

Nous avons employé, comme antigène, des suspensions d'une souche, sans virulence, de *B. anthracis*, cultivés dans l'agar-sérum, et diverses fractions de ses extraits, préparées par la technique suivante: les *B. anthracis* sont suspendus avec de l'eau physiologique, centrifugés et lavés deux fois. Le résidu (fraction A) est donc formé par des *B. anthracis* lavés.

Le liquide surnageant de la première émulsion (appelé fraction B) contient les diverses substances extractives du *B. anthracis*. De la fraction B nous avons séparé deux autres fractions différentes: une, par acidification avec l'acide sulfurique jusqu'à pH. 3.8 - 4. - qui détermine la précipitation d'une substance de nature nucléoprotéique (appelée fraction C), impurifiée par d'autres substances par adsorption - et l'autre, par addition d'alcool avec acétate de sodium. Dans ces conditions, (la réaction doit rester alcaline), on obtient un précipité avec les caractères d'un hydrate de carbone complexe (fraction D) qu'on purifie par élimination des substances précipitables à pH. 3.8 - 4.

La dissolution et précipitation de ces deux substances nous a permis d'arriver à une certaine purification et à l'obtention de solutions aqueuses alcalines claires.

L'immunisation des chevaux fut réalisée par voie veineuse avec les quatre fractions suivantes:

A = *B. anthracis* lavés.

B = Premier liquide surnageant de l'émulsion de *B. anthracis*.

C = Nucléoprotéines du *B. anthracis*.

D = Substance spécifique soluble du *B. anthracis* ayant la nature d'un hydrate de carbone complexe.

La recherche des anticorps de fixation a été réalisée après trois mois et demi d'immunisation avec la technique déjà décrite par SORDELLI et ses collaborateurs².

On a employé la partie du sérum soluble dans l'eau distillée, saturée d'acide carbonique, et comme antigènes des émulsions de *B. anthracis* cultivé dans le bouillon et dans l'agar-sérum.

On a obtenu les résultats suivants:

Sérum préparé avec:	Limite de fixation (en c ³) avec:	
	<i>B. anthracis</i> (agar-sérum)	<i>B. anthracis</i> (bouillon)
Antigène A	< 0.001	0.002
„ B	< 0.001	0.002
„ C	< 0.001	0.005
„ D	> 0.02	> 0.02

Ces chiffres montrent l'activité antigénique des trois premières fractions et l'inactivité de la quatrième, c'est à dire de la substance spécifique soluble du *B. anthracis*.

RESUMÉ: *Les anticorps de fixation du complément du B. anthracis semblent être produits par substances du type de nucléo - protéines ou par substances protéiques adsorbées dans le précipité produit par acidification des extraits du B. anthracis.*

2. A. SORDELLI, P. BELTRAMI Y C. HARISPE. *Las sensibilizatrices del suero anticarbun-cioso*. Rev. del Inst. Bact. del D. N. de H., vol. V, N° 3, págs. 376-398. Buenos Aires, julio 1928.

MISCELÁNEA

Las técnicas histológicas para el estudio de la microglia *

El hallazgo y descripción de la microglia (DEL RÍO HORTEGA), así como el estudio de su estructura normal y patológica y el de su histogénesis (DEL RÍO HORTEGA), que sin el previo y correcto conocimiento de éstos es imposible encarar nin-soluble al empleo de los métodos de impregnación argéntica de P. DEL RÍO HORTEGA que, sin el previo y correcto conocimiento de éstos es imposible encarar ningún problema que se relacione con ese elemento celular del sistema nervioso.

Ahora bien, el dominio de tales procedimientos sólo se alcanza mediante una grande y continuada práctica *personal*, pues — contrariamente a lo que de ordinario ocurre en Histología — trátase de técnicas cuyo mínimo de resultados utilizables, más que de la estricta aplicación de las normas establecidas, depende de la oportuna introducción, en cada caso y ambiente, de pequeñas modificaciones en los diferentes tiempos que constituyen los métodos, variantes que casi siempre están relacionadas con la concentración y período de acción de las soluciones usadas. Con esto, además de señalarse las dificultades que los métodos de P. DEL RÍO HORTEGA oponen a la obtención regular de buenas impregnaciones, se explica también el origen de la serie de otras técnicas afines aparecidas, cuyo número aumentará seguramente con la difusión que adquieran las investigaciones sobre microglia, y cuyo propósito y beneficio son, en último análisis, permitir la impregnación de esta célula en muchos de los casos en los cuales la aplicación del método original suministra resultados defectuosos o negativos.

Para servir este mismo propósito nos ha parecido útil la reproducción conjunta de todas las técnicas publicadas, a las cuales añadiremos algunos detalles que han favorecido nuestra propia experiencia personal, en la ciudad de Buenos Aires.

Esta exposición se divide en tres partes. La primera comprende el detalle del instrumental e ingredientes necesarios, juntamente con la ordenada enumeración de las soluciones que se emplean en estos métodos. La segunda parte contiene la descripción de las diferentes técnicas. La tercera reúne brevísimas consideraciones sobre los resultados.

I

INSTRUMENTAL. Microtomo para cortes en congelación. Cápsulas de Petri. Cápsulas de vidrio (3,5 c. de diámetro por 1,5 c. de alto). Vidrios de reloj para usar como tapas de estas últimas cápsulas. Ganchos de vidrio para manipular los cortes. Frascos de vidrio color caramelo, tapa esmerilada, de 250, 500 y 1.000 c³ de capacidad. Frascos de boca ancha de 100 c³, para fijar y conservar las piezas anatómicas. Papel negro a usar como fondo de contraste para el contenido de las cápsulas. Papel de filtro. Agujas de histología. Micromechero de gas o lámpara de alcohol. Trípode de hierro de 22 c. de alto. Lámina de amianto de 15 x 15 c. x 3 mm. Porta-objetos comunes. Cubre-objetos.

* SINONIMIA: mesoglia DEL RÍO HORTEGA; mesoglia *in partibus* ROBERTSON; tercer elemento *in partibus* CAJAL; célula de Hortege ("Hortegazelle") METZ y SPATZ; célula en bastoncito ("Stäbchenzelle") NISSL; célula granulosa o adiposa, célula gránulo-adiposa ("Körnchenzelle", "Gitterzelle") NISSL; célula de remoción *in partibus* ("Abräumzelle" *in partibus*) MERZBACHER.

INGREDIENTES. Agua bidestilada¹. Agua destilada. Formaldehido² MERCK o KAHLBAUM. Bromuro de amonio. Alcohol de 96° Acido fénico cristalizado. Xilol. Creosota de haya. Hiposulfito de sodio. Cloruro de oro amarillo. Sulfito de sodio cristalizado. Carbonato de sodio cristalizado. Acido clorhídrico. Ferrocianuro de potasio. Piridina. Acetona. Glicerina pura. Acido bromhídrico. Hidrato de sodio. Antiformina. Carbonato de sodio anhidro, *pro analysi*, KAHLBAUM. Nitrato de plata, *pro analysi*, KAHLBAUM. Amoniaco, *pro analysi*, KAHLBAUM. Resina de *Dammar*, en terrones.

SOLUCIONES.

A. FIJADORAS: 1ª Solución de formol al 10 % (para el invierno) y al 15 % (para el verano). 2ª *Formol-bromuro*: agua dest. 430 c³, bromuro de amonio 10 g., formaldehido 70 c³. 3ª *Fijador de BOLSI*: agua dest. 75 c³, bromuro de amonio 3 g., formaldehido 15 c³, piridina 5 c³, acetona 5 c³. 4ª *Fijador de DUBRANSKY*: agua dest. 100 c³, formaldehido 6 c³, carbonato de sodio cristalizado 6 g., solución acuosa de amoniaco al 20 %: V gotas.

B. REFORZADORAS DE LA FIJACIÓN: 1ª Agua dest. 430 c³, bromuro de amonio 10 g., formaldehido 70 c³. 2ª Agua dest. 70 c³, bromuro de amonio 3 g., formaldehido 30 c³. 3ª Agua dest. 400 c³, bromuro de amonio 15 g., formaldehido 100 c³. 4ª Solución de formol al 20 % y piridina en partes iguales.

C. RESTAURADORAS: 1ª Agua dest. 20 c³, amoniaco II gotas. 2ª Agua dest. 30 c³, amoniaco XX gotas. 3ª Agua dest. 20 c³, amoniaco IV gotas. 4ª Agua dest. 160 c³, glicerina 40 c³, amoniaco C gotas. 5ª Agua dest. 20 c³, solución de hidrato de sodio al 40 %: I gota. 6ª Agua dest. 90 c³, amoniaco 10 c³. 7ª Agua dest. 2 c³, antiformina 3 c³, alcohol de 96°: 8 c³. 8ª Alcohol de 96°: 20 c³, glicerina 20 c³, solución de formol al 5 %: 60 c³. 9ª Glicerina 30 c³, solución de formol al 5 %: 70 c³. 10ª Solución acuosa de carbonato de sodio cristalizado al 5 %: 11ª Sol. acuosa de carbonato de sodio crist. al 10 %.

D. MORDIENTES: 1ª Piridina, amoniaco, agua dest. en partes iguales. 2ª Solución acuosa de sulfito de sodio cristalizado al 5 %. 3ª Solución acuosa de ácido clorhídrico al 10 %. 4ª Solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 10 %: 45 c³, solución acuosa de ácido clorhídrico al 10 %: 55 c³. 5ª Solución acuosa de carbonato de sodio cristalizado al 1 %. 6ª Solución acuosa de ácido bromhídrico al 5 %. 7ª Solución acuosa de ácido bromhídrico al 10 %. 8ª Solución acuosa de bromuro de amonio al 2,5 %. 9ª Solución acuosa de bromuro de amonio al 10 %.

E. COLORANTES³: I. *Carbonato argéntico*. Se preparan las soluciones siguientes:

1ª Nitrato de plata al 10 %. 2ª Carbonato de sodio anhidro al 2,7 g. %. 3ª Carbonato de sodio anhidro al 5,4 g. %.

1. En la ciudad de Buenos Aires su uso es indispensable para la preparación de las soluciones argénticas. La primera destilación se realiza mediante un alambique de cobre. La segunda por medio de un aparato totalmente construido con vidrio neutro; la unión entre el balón dador y el refrigerante se establece con un manguito de gasa desengrasada y limpia. Esta segunda destilación se hace sobre granalla de zinc e hidrato de bario.

2. Empleado como fijador y como reductor, el formaldehido debe neutralizarse previamente con carbonato de calcio, substancia que se agrega en cantidad abundante. La mezcla se revuelve varias veces y, al cabo de varios días, se hace decantar; la porción transparente, sobrenadante, se utiliza para la preparación de las soluciones.

3. Para la preparación de éstas es de rigor el uso de agua bidestilada.

Fórmula a: Sobre 50 c³ de solución de nitrato de plata (1^a)*, verter 200 c³ de solución de carbonato de sodio (2^a). Disolver el precipitado producido con amoníaco, substancia que se agrega gota a gota, agitando suavemente. Evitar un exceso de amoníaco. Completar el volumen con agua bidestilada hasta 400 c³.

Fórmula b. Solución de nitrato de plata (1^a): 50 c³; solución de carbonato de sodio (2^a): 200 c³; amoníaco en cantidad suficiente.

Fórmula c. Solución de nitrato de plata (1^a): 50 c³; solución carbonato de sodio (2^a): 200 c³; amoníaco en c. s.; agua bidestilada 750 c³.

Fórmula d. Solución de nitrato de plata (1^a): 100 c³; solución de carbonato de sodio (3^a): 150 c³; amoníaco en c.s.

II. Solución de nitrato de plata al 20 %.

III. *Oxido de plata amoniacal.* Se preparan las soluciones siguientes: 1^a Nitrato de plata al 10 %. 2^a Nitrato de plata al 20 %. 3^a Lejía de soda al 40 %.

Fórmula a (DEL RIO HORTEGA Y CAJAL). Sobre 20 c³ de solución de nitrato de plata (1^a), verter XXII gotas de lejía (3^a). Una vez que el precipitado esté totalmente formado y sedimentado, quitar el líquido sobrenadante. Lavar varias veces el precipitado con agua bidestilada, empleándose en esta operación 250 c³ de agua. Agregar al pp. lavado 110 c³ de agua bidestilada y disolverlo, con amoníaco, añadido gota a gota. Cada gota de amoníaco se agrega sólo después de que el líquido ha perdido el olor característico que le ha dado la gota precedente. Durante este tiempo, no olvidar la constante y suave agitación del pp. Evitar un exceso de amoníaco.

Fórmula b. Solución de nitrato de plata (2^a): 5 c³; solución de lejía de soda (3^a): VI gotas. Lavar varias veces el pp. con agua. Agregar 5 c³ de agua bidestilada y luego amoníaco, gota a gota. Completar con agua bidestilada hasta 25 c³.

IV. Solución de fucsina, según ZIEHL = III gotas y agua destilada 10 c³.

F. REDUCTORAS: 1^a Solución de formol al 1 %, 2 %, 3 %, 5 % y 10 %. 2^a solución de formaldehído al 1/2-1 %: 20 c³, solución de nitrato de plata al 20 %: I gota.

G. VIRADORA. Solución acuosa de cloruro de oro amarillo al 1/500.

H. FIJADORA. Solución acuosa de hiposulfito de sodio al 5 %.

I. ACLARANTE. Xilol 90 c³, ácido fénico 30 c³ y creosota de haya 13 c³.

K. MEDIO DE INCLUSION: En nuestra experiencia personal empleamos una solución espesa de resina de *Dammar* en xilol. (Este medio de inclusión que, ya hace mucho tiempo, el Prof. Chr. JAKOB reconociera como muy superior al bálsamo de Canadá, reemplaza a esta substancia muy ventajosamente.) Preparamos este medio de acuerdo con la técnica de JAKOB: disolver en xilol los terrones de resina *Dammar*, a una temperatura moderada, no olvidando que el solvente es fácilmente inflamable. Esta solución, que debe ser fluída, se recoge en frascos para que sedimente en algunos meses, pues la resina contiene muchas suciedades. Ya clarificada, se hace evaporar una parte del xilol, hasta conseguir la consistencia necesaria.

* La cifra ordinal que está en el paréntesis es también la misma que, en un lugar inmediatamente anterior del texto, precede la enunciación del detalle de la solución correspondiente.