

nía en las zonas de contacto de las colonias y se expandía en las zonas libres. Examinando con el microscopio el borde de este micelio profundo, notamos la existencia de numerosos filamentos con cadenas de blastosporos debajo de cada tabique y terminados en ocasiones igualmente por una cadena de blastosporos, caracteres que recuerdan los del género *Candida*. Es decir, que la forma S de *M. albicans* presenta en ciertas condiciones de cultivo, caracteres morfológicos comparables a los hongos del género *Candida* y a los de las cepas RS 65 y RS obtenidas en los ensayos efectuados para obtener la reversión de la forma R a la S de *M. albicans*.

La forma R ha sido ya observada en otros hongos levuriformes; por SEPELLI y GUIO (1932) en el *Saccharomyces cerevisiae* y por FABIAN y MC CULLOUGH en los *Saccharomyces cerevisiae* y *ellipsoideus*, *Willia anomala* y *Zygosaccharomyces mandshuricus*.

Comunidad antigénica entre las toxinas de *B. hemolyticus*, *B. gigas*, *B. perfringens* y *B. oedematiens*

A. SORDELLI y J. FERRARI

La naturaleza del agente etiológico de la hemoglobinuria bovina (Chile y Argentina) ha sido establecida de manera precisa por las investigaciones que hemos realizado en colaboración con PRADO reconociendo que dicho agente etiológico es idéntico al germen descrito por VAWTER y RECORDS para la hemoglobinuria del ganado de Nevada y cuyo nombre correcto, dado por HALL es el de *Bacillus hemolyticus*.

La diferenciación de esta bacteria de sus congéneres anaerobios es relativamente fácil y sino hemos considerado la posibilidad de una confusión o dificultad diagnóstica se debe a la uniformidad y congruencia de todos nuestros resultados experimentales.

Los trabajos chilenos (SANZ) y la opinión del Dr. EUGENIO SUAREZ constituyen, sin embargo, una contradicción manifiesta de nuestros resultados, pero ni los propios autores citados ni nosotros mismos pudimos demostrar la existencia ni participación del *B. perfringens* en la etiología de la hemoglobinuria bovina. Esta afirmación expresada ya en nuestra primera memoria estaba sustentada en la falta de neutralización del poder patógeno del cultivo de *B. hemolyticus* por medio del suero antiperfringens y además en la diferencia profunda del cuadro anatómico que presentaban los cobayos muertos por infección de *B. hemolyticus* y *B. perfringens*.

Nuestro interés por el estudio de la complejidad antigénica o multiplicidad de los tóxicos producidos por las bacterias anaerobias, ya despertado por la demostración de la existencia de un complejo tóxico característico, del grupo *Perfringens-paludis-ovitoxicus-agni* fué poderosamente atraído por la publicación de A. DEMNITZ* que trata precisamente del *B. hemolyticus* y del estrecho parentesco de sus toxinas con las del *B. gigas*, agente del Bradsot (Zeissler).

DEMNITZ, en efecto, ha establecido que las diferencias de las lesiones anatómicas producidas por ambas bacterias son debidas a toxinas diferentes, mien-

* A. DEMNITZ, *Chemiczu Medizin*, t. II, p. 303-309, 1934. Zur frage der Identität des *B. gigas* (ZEISSLER) und des Erregers einer an der Anden-Gebiet Nord und Süd Amerikas Vorkommenden Haemoglobinurie der Rinder.

tras una toxina común confiere a ambas bacterias la sobresaliente capacidad hemolítica de que están dotadas.

Este hecho adquiere una mayor importancia apenas se considera que la cuota tóxica que diferencia a *B. hemoliticus* de *B. gigas* es común a este último con *B. oedematiens*. Se repite así con otros grupos de bacterias el hallazgo de los autores ingleses realizado con el grupo *Perfringens-ovitoxicus paludis-agni*, con la diferencia, a nuestro modo de ver, de que la comunidad de toxinas entre *B. gigas* y *B. oedematiens* no está acompañada de analogías tan profundas de otro orden biológico como sucede con el grupo *Perfringens*. Se trataría, pues, de un fenómeno análogo al observado para antígenos no tóxicos y que es conocido con el nombre de heterofilia.

La repetición de los experimentos comunicados por A. DEMNITZ nos ha conducido a examinar un poco más profundamente el problema y los resultados obtenidos serán expuestos en este trabajo.

La diferencia de *B. gigas* y *B. hemolyticus* está ya justificada, según Demnitz, por los cuadros anatómicos diferentes que producen ambas bacterias, pues mientras la primera determina lesiones de *B. oedematiens*, la segunda especie (*B. hemolyticus*) produce lesiones muy intensamente congestivas. Los cobayos inoculados por nosotros con cultivos jóvenes de ambas bacterias han muerto con las lesiones ya descritas para *B. hemolyticus*, de manera que en las condiciones de nuestros experimentos no podemos diferenciar ambas especies por las lesiones anatómicas. Probablemente DEMNITZ usó para tales experimentos cultivos de más tiempo (7 días), pues así lo permite suponer la técnica descrita para otros ensayos. Nosotros nos hemos visto obligados a emplear cultivos más jóvenes por la rápida reducción del poder patógeno por envejecimiento, de modo que no nos ha sido posible verificar dicha hipótesis. Es conveniente hacer notar que las cepas usadas por nosotros nos habían sido amablemente enviadas por el propio Dr. A. DEMNITZ lo cual descarta la posibilidad de que nuestras designaciones de *B. gigas* y *B. hemolyticus* no concuerden con las del citado autor.

La semejanza de las lesiones nos condujo a profundizar las investigaciones recurriendo a los métodos de neutralización de la hemotoxina y del poder patógeno para cobayos por los sueros específicos. Estos fueron preparados por inmunización de caballos con toxina de *B. hemolyticus* y *B. gigas*. La influencia de los sueros normales fué investigada con el suero de los mismos animales que luego fueron inmunizados. De nuestros experimentos hemos obtenido los siguientes resultados:

a) Las hemotoxinas de *B. hemolyticus* y de *B. gigas* son prácticamente iguales, pues existe la neutralización cruzada de las toxinas por los dos sueros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe una especificidad relativa cuya naturaleza debiera ser investigada por un método de saturación.

En efecto, la actividad del suero *antigigas* para la toxina *B. gigas* es de 200 y sólo de 100 para la *B. hemolyticus*, mientras que las del suero *antihemolyticus* es de 500 para la toxina *B. hemolyticus* y de sólo 200 para *B. gigas*. Hay que tener en cuenta que las mismas toxinas han sido usadas simultáneamente y que los sueros de los animales antes de la inmunización no tenían ninguna diferencia en su contenido de anticuerpos neutralizantes de las hemotoxinas.

b) El poder patógeno de *B. hemolyticus* es neutralizado por el suero *antigigas* y el del *B. gigas* por el suero *antihemolyticus*, de modo que pueden considerarse a ambas materias como cualitativamente iguales en lo que respecta a la constitución de sus antígenos de agresión (toxinas). Si el experimento

es realizado con cantidades crecidas de suero (p. ej. 1 cm³) no se puede demostrar ninguna diferencia entre ambas bacterias, mas si se reducen los dos sueros aparecen de manera muy clara diferencias cuantitativas manifiestas, así por ejemplo mientras la actividad neutralizante de un suero antigigas para el poder patógeno de un cultivo de 20 horas de *B. gigas* es de 100, es sólo de 5 para un cultivo de *B. hemolyticus*. Por otra parte, un suero antihemolyticus tiene un valor neutralizante de 50 para *B. hemolyticus* y de 10 para *B. gigas*.

Como los cultivos usados son los mismos y los sueros normales de los caballos no tienen ningún poder protector, puede afirmarse: 1° que entre *B. gigas* y *B. hemolyticus* existe comunidad de antígenos de agresión (cualitativo), y 2° que dichos antígenos difieren cuantitativamente.

Sin embargo, la primera conclusión para ser correcta debiera estar fundada en experimentos de igual naturaleza que las de la absorción cruzada, que son de uso corriente para la investigación de la estructura antigénica, o en el uso de un indicador más sensible y exacto que la enfermedad o la muerte de un animal.

Además, si la neutralización cruzada puede resolver el problema de la identidad de dos bacterias cuando las cifras de actividad de los sueros son idénticas, no creemos, como ya lo hemos dicho, que cuando las diferencias son de orden cuantitativo, esté justificada la presunción de una identidad cualitativa.

c) La comunidad parcial de las toxinas de *B. oedematiens* y *B. gigas* demostrada por A. DEMNITZ fué confirmada por todos nuestros experimentos de manera clara. En efecto, el cultivo de *B. gigas* es neutralizado por el suero *B. oedematiens*, aunque bien es cierto que la cantidad necesaria para neutralizar dos clases mortales de *B. gigas* es suficiente para neutralizar varios miles de dosis mortales del *B. oedematiens*.

Además, como el suero antigigas neutraliza la toxina de *B. oedematiens* (1 cm³ aproximadamente 100 DLM) no queda ninguna duda de la comunidad antigénica parcial de las toxinas producidas por *B. gigas* y *B. oedematiens*.

En cuanto a *B. hemolyticus* que DEMNITZ ha encontrado diferente en este respecto al *B. gigas*, no podemos ser tan categóricos, pues tanto el suero *oedematiens* puede neutralizar el poder patógeno de *B. hemolyticus* cuanto el suero preparado con la toxina de esta bacteria neutraliza la toxina de *B. oedematiens*. Es, sin embargo, evidente que la cuota *oedematiens* del *B. hemolyticus* es mucho menor que la del *B. gigas*.

Esta contradicción con los hallazgos de DEMNITZ es sólo de grado, pues, por una parte, ya en la comunicación de este autor aparece la propiedad *oedematiens* de *B. gigas* como inconstante y de intensidad variable en las cepas que la tienen, y, por la otra, en nuestros experimentos las diferencias entre las cuotas *oedematiens* de *B. gigas* y *B. hemolyticus* son tan grandes que pueden justificar las conclusiones del autor alemán. (La relación entre dichas cuotas *oedematiens* es de 1 a 10).

Un hecho que llama inmediatamente la atención, tanto en la comunicación de DEMNITZ como el que fué observado en el curso de nuestros numerosos experimentos, es la variabilidad del poder patógeno del *B. gigas*, su rápida desaparición, y la diferente proporción del factor *oedematiens* que se observa tanto en *B. gigas* como *B. hemolyticus*. El medio de cultivo y el tiempo de incubación tienen seguramente una influencia decisiva, de modo que es de la mayor importancia precisar exactamente las condiciones experimentales para que el problema quede determinado.

Nuestra larga experiencia en *B. hemolyticus* nos ha demostrado, además, que su poder patógeno y hemolítico puede desaparecer tan fácilmente que para poder repetir ciertos experimentos es imprescindible recurrir a los gérmenes conservados en vacío seco.

Todo esto nos impone ser muy cautelosos en el asunto de la naturaleza y propiedades de las toxinas de las bacterias anaerobias, sobre todo cuando se trata del empleo de dichas toxinas en la preparación de los sueros antitóxicos para el tratamiento o prevención de la gangrena gaseosa. Esta preocupación nos indujo a realizar hace ya algunos años una investigación sobre la relación entre la actividad antigénica de los filtrados de *B. perfringens*, la actividad antitóxica de los sueros preparados con dichas toxinas y su relación con el poder neutralizante de la infección experimental y del poder antihemolítico. Nuestros experimentos nos condujeron a admitir la existencia de un solo antígeno de agresión tóxica, diferente, sin duda, de la cuota hemolítica. Como es fácil apreciar, este asunto de la pluralidad o unidad de los antígenos de agresión tiene una importancia práctica capital y debe ser estudiado con mucha atención.

En el estudio de la constitución antigénica de los aglutinógenos de 2 distintas bacterias se usa como criterio de la identidad antigénica la absorción cruzada completa de las 2 bacterias y de los 2 sueros. Tal experimento no se puede reproducir con los antígenos tóxicos solubles, de modo que no queda en general más criterio que el derivado de la neutralización cruzada. Cuando las cifras obtenidas por estos experimentos son idénticas, la presunción de identidad adquiere prácticamente el valor de una certeza, pues si existen antígenos no comunes su actividad o concentración no desempeña seguramente papel en la agresión.

Debemos, sin embargo, considerar que su participación puede ser importante en el desarrollo de las lesiones y que su presencia debe ser tomada en cuenta en la patogenia.

En el caso de la neutralización cruzada representada por cifras diferentes tienen igual valor interpretativo las hipótesis de antígenos idénticos presentes en proporción diferente o de antígenos idénticos presentes en proporción diferente, además de antígenos secundarios cualitativamente distintos.

La primera hipótesis ha sido ya utilizada por nosotros (SORDELLI y PACHELLA) para explicar la diferente neutralización de 2 venenos de una misma especie (*Bothrops alternata*) por 2 sueros preparados con un veneno mixto en dos caballos diferentes. En cuanto a la segunda hipótesis, si bien sólo será necesario utilizarla cuando un hecho experimental preciso nos obligue a ello, debe ser tomada muy en cuenta en la investigación de los problemas que estamos considerando.

En el caso especial de *B. gigas* y *B. hemolyticus* hemos encontrado la ocasión de necesitar de la última hipótesis, puesto que la identidad cualitativa deducida de la completa neutralización cruzada que hemos mencionado fué invalidada por el hallazgo de una cuota *Perfringens* en *B. hemolyticus* que no existe en *B. gigas*.

El cultivo de *B. hemolyticus* es neutralizado en su acción patógena por un suero *perfringens* muy activo con dosis 10 veces mayores que la del propio suero *hemolyticus*; en cambio, el poder patógeno de *B. gigas* no es modificado por dosis 100 veces más altas que las dosis neutralizantes de suero *anti-gigas*. Estas experiencias fueron corroboradas después de confirmar la pureza de *B. hemolyticus*. Además, el suero *antihemolyticus* neutraliza bien la toxina precipitada de *B. perfringens* (0,2 cm³ neutraliza 10 DLM de toxina) y el suero anti *B. gigas* carece de dicha actividad.

Estos experimentos sólo pueden ser interpretados admitiendo comunidad antigénica entre la toxina de *B. perfringens* y algún antígeno de agresión del *B. hemolyticus*, que es a su vez capaz de engendrar antitoxina para la toxina seca de *B. perfringens*. Inmediatamente se plantea el problema de la naturaleza de los antígenos de agresión de *B. perfringens* que puede ser investigado por el empleo de un suero que como el antihemolyticus neutraliza la toxina precipitada de *B. perfringens*.

Los resultados de nuestros ensayos son irregulares y no permiten afirmar si la toxina de *B. perfringens* tiene toda la capacidad de agresión de *B. perfringens*.

En resumen, el estudio de la relación antigénica entre las toxinas y las sustancias de agresión de *B. gigas* y *B. hemolyticus* nos ha revelado: 1º que la constitución de este complejo de agresión es variable para la misma cepa; 2º que entre *B. gigas* y *B. hemolyticus* existe una semejanza muy grande del complejo de agresión en el cual participan toxinas específicas comunes a *B. gigas* y *B. hemolyticus*, además de la toxina propia de *B. oedematiens*; 3º que entre *B. perfringens* y *B. hemolyticus* existe comunidad parcial del complejo de agresión, comunidad que no existe entre *B. gigas* y *B. perfringens*.

A L M E D I C O

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se beneficia casi siempre con el auxilio prestado por las pruebas de laboratorio, pues los resultados positivos de éstas o confirman los datos obtenidos en el estudio clínico o, en los casos de sintomatología confusa o levemente esbozada, aclaran y deciden acerca de la verdadera etiología del proceso morbido en curso.

Ahora bien, respecto de las pruebas suerológicas en particular, cabe afirmar que su valor depende en absoluto del correcto empleo de técnicas y antígenos apropiados, por lo cual resulta imprescindible el continuado y metucioso estudio de los métodos para poder eliminar en lo posible los factores de error.

En este sentido desde hace algunos años el Instituto Bacteriológico ha emprendido la tarea de perfeccionar las técnicas utilizadas en sus laboratorios para establecer el diagnóstico suerológico de la FIEBRE TIFOIDEA, por tratarse de la reacción más frecuentemente pedida y en la cual se registra además el mayor número de resultados equivocados, y hoy ya se encuentra en condiciones de realizar tales análisis con procedimientos seguros. Por tanto, se pone a disposición de los Señores Médicos para efectuar dicha prueba suerológica, ofrecimiento que también se extiende al estudio biológico de los presuntos casos de BRUCELOSIS y TIFUS EXANTEMÁTICO.

El Instituto Bacteriológico facilita el envío de muestras de sangre, mediante la remisión, a quien lo solicite, de envases estériles listos para devolver por correo libre de porte. El resultado del análisis es comunicado inmediatamente por teléfono o telégrafo.