

Estudios sobre difteria

2da. COMUNICACION

ESTUDIO DE DOS CEPAS DE *C. DIPHTHERIAE* VAR. MITIS DE GRAN VIRULENCIA

(Contribución al conocimiento de los antígenos de agresión de la bacteria de Loeffler) (1)

Por los Dres. A. SORDELLI, A. MANZULLO y F. PENNIMPEDE

La especie *C. diphtheriae* está constituida, como muchas otras especies de bacterias, por un número crecido de «variantes»; esta designación solo significa que cepas de distinto origen pueden presentar diferencias que por ser estables implican la existencia de un carácter que debe ser tenido en cuenta. A su presencia puede atribuírsele importancia causal en la enfermedad humana y de ahí el interés en reconocer tales variantes. Muchas veces se ha investigado este asunto sin resultados aparentes, hasta que ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD y THOMSON encuentran las variantes conocidas como Mitis y Gravis, agentes de difterias benignas y graves respectivamente. A estas dos se agrega la forma designada Intermedia y con las tres se hace más claro el vínculo de la forma clínica y de la patología de la difteria con ciertas propiedades del cultivo de la bacteria de LÖEFFLER. A pesar de que no existe unánime acuerdo respecto de este asunto, es evidente que en muchas partes del mundo se aíslan *C. diphtheriae* que corresponden a las descripciones de McLEOD y colaboradores aunque no tienen siempre las diferencias de calidad patógena descubierta por los investigadores de Leeds.

La diferencia de constitución antigénica fué establecida por el fenómeno de la aglutinación ya en el año 1896 por NICHOLAS y más tarde confirmadas por otros autores. DURAND y GUERIN en 1918-1921 clasificaron en cinco grupos (mejor dicho en seis grupos) las cepas que estudiaron, estableciendo el hecho interesante que de cada uno de los pequeños brotes diftéricos se aislaban bacterias del mis-

(1) Los autores agradecen a los doctores H. RUGIERO e I. PIROSKY el concurso prestado en este trabajo, y quedan igualmente reconocidos al Dr. J. M. MIRAVENT por haber facilitado parte del material estudiado.

mo grupo antigénico. EAGLETON y BAXTER (1923) dividieron sus cepas en diez grupos, siempre por aglutinación, confirmando el hallazgo de DURAND y GUERIN acerca de la homogeneidad del tipo de cada pequeña epidemia. Además se estableció que no existía vinculación entre los aglutinógenos y la virulencia. Estos resultados fueron confirmados por SCOTT.

ORR EWING (1933) estudia los fermentadores del almidón (*Gravis*) y los divide en cuatro grupos; ROBINSON y PEENEY los dividen en cinco grupos, cuatro de los cuales son idénticos a los de ORR EWING. Para estos autores los diez tipos de EAGLETON y BAXTER no contienen sino pocos fermentadores del almidón, de modo que los resultados no son comparables.

ROBINSON y PEENEY encuentran que la mayor parte de las cepas de *Gravis* pertenecen a dos tipos (I y II) y ambos son de igual forma de colonia (*daisy head*) con la sola excepción de dos cepas entre 678. Los tipos III, IV y V son de cepas cuyas colonias son de tipo «S» y semejantes a *Mitis* (61 cepas sobre el total de 749). ROBINSON ha demostrado en 1934 que la variación *in vitro* del tipo de colonia no está acompañada del cambio de la estructura antigénica.

La asociación entre la propiedad fermentativa del almidón y el tipo antigénico no es tampoco absoluta, es decir, que algunas cepas, pocas bien entendido, del tipo I no fermentan almidón. Menos absoluta todavía parece ser la asociación entre el tipo antigénico II y el poder fermentativo del almidón.

La distribución geográfica de los tipos tiene rasgos interesantes tales como la del tipo I que fué encontrada 390 veces en 392 en Inglaterra, mientras el tipo II sólo 25 veces sobre 286. OKELL encuentra que las cepas no toxigénicas pertenecen a un número grande de tipo antigénico.

Es aventurado todavía, afirmar nada, acerca de este grupo, constituido en algunas partes del mundo por un gran número de representantes desprovistos de poder patógeno, pues en tales casos la falta de poder patógeno impide tener certidumbre respecto de la verdadera naturaleza diftérica del microbio, cosa que existe cuando las bacterias producen toxina diftérica.

El tipo antigénico de las bacterias aisladas de un mismo paciente es para ROBINSON y PEENEY constante, mientras EAGLETON y BAXTER, y SCOTT encuentran una variación.

En cuanto a la importancia del tipo antigénico vinculado a la agresión, DUDLEY menciona el hecho de la aparición de una pequeña epidemia de difteria muy benigna en niños vacunados correctamente y con un índice de portadores relativamente elevado, después

de la invasión por un tipo Gravis del mismo grupo suerológico del predominante en Leeds. Este hecho apoya la idea de que este tipo suerológico del *C. diphtheriae* Gravis es más infeccioso e invasor que el tipo corriente aislado de los portadores.

Para SCOTT (citado de ROBINSON y PEENEY, 1936) los anticuerpos (no antitoxina) de un sujeto tienen importancia en la invasión por la bacteria de LÖEFFLER y su presencia puede impedir la agresión de una bacteria toxigénica. Se entiende que los anticuerpos deben ser los específicos del microbio particular de cada caso. Por interesantes que sean ésta y otras suposiciones por el estilo, no tienen por ahora sino el valor de tales.

Debemos considerar además en esta breve introducción la disociación de dos características importantes: la propiedad toxigénica *in vitro* y la virulencia o poder de invasión experimental del *C. diphtheriae*.

Es conocido desde hace mucho tiempo que hay bacterias muy virulentas (para el cobayo) y poco toxigénicas *in vitro* y bacterias poco virulentas (para el cobayo) muy toxigénicas. Las diferencias observadas por CARY son del siguiente orden: la cepa PARK WILLIAMS 8 tiene para un poder tóxico de 120 dosis letales mínimas por cm³ una virulencia tan baja que sólo mata al cobayo con 2.000 millones de bacterias, mientras que la cepa 2059 tiene una virulencia 300 veces mayor y una capacidad toxigénica 60 veces más pequeña.

Por último añadiremos que a pesar de todas las diferencias de estructura antigénica, de morfología, de propiedades bioquímicas y de virulencia, hay una propiedad que es común a toda bacteria de LÖEFFLER patógena; la toxina, que es neutralizada por una sola antitoxina. Puede decirse también que experimentalmente la neutralización de la toxina por la antitoxina es suficiente para bloquear la acción patógena del *C. diphtheriae* cuando se utiliza el cobayo como animal de experiencia.

I

En la presente comunicación nos ocuparemos de un hecho que está vinculado al problema de la existencia de antígenos de agresión de la bacteria de LÖEFFLER distintos de la toxina, y aunque lo dicho en la introducción no se aplica específicamente a la cuestión que se expone, ésta, por formar parte de la doctrina que se apoya en los hechos citados, debe ser juzgada teniendo en cuenta esos y otros análogos antecedentes de la copiosa literatura del tema.

En los estudios sistemáticos sobre la difteria llevados a cabo en el

Instituto Bacteriológico desde el año 1936, e intensificados desde la creación del Centro de Diagnóstico Bacteriológico de la Difteria en 1939, se ha podido comprobar: 1º la existencia de tipos que corresponden perfectamente a la descripción de McLEOD et al., 2º que la frecuencia de esos tipos en 1.390 cepas aisladas es de 63,82 % Mitis, 15,46 % Gravis y 20,72 % Intermedio, 3º que sólo una de esas cepas proveniente de un esputo de un paciente sin afección diftérica, carece de poder patógeno para el cobayo, 4º que con la sola excepción de las dos cepas que se estudian en esta memoria todas han sido neutralizadas fácilmente por el suero antidiftérico antitóxico.

Con el material de estudio acumulado se abordarán a su debido tiempo los asuntos que plantea la existencia de las tres variantes, Gravis, Mitis e Intermedio, y los tipos suerológicos tratando en esta ocasión solamente de un hecho que juzgamos interesante y digno de comunicar en seguida.

El día 16 de setiembre de 1939 se recibe enviado por el Dr. MIRAVENT un hisopo con el material de un exudado de un caso de difteria común benigna ocurrido en una niña vacunada. Se aísla una cepa de *C. diphtheriae* Mitis (F.). Esta niña continúa siendo portadora en los meses de enero, marzo y abril de 1940.

Días antes había sido enviado del Hospital Muñiz por el Dr. RUGIERO un material (entre los que corrientemente se examinan, de acuerdo a un plan de investigación en curso de ejecución) proveniente de un enfermo de difteria. Se aísla una cepa de *C. diphtheriae* cuyas características la colocan entre las del tipo Mitis.

El primer caso no presentó cuadro clínico de particular interés, en cambio el segundo tuvo una forma clínica de tipo maligno que terminó con el fallecimiento del enfermo a los cinco días. La descripción resumida que sigue da una idea de la evolución del caso.

Enfermedad actual: Se inicia el 9 de setiembre con decaimiento general y vómitos; guarda cama. El día 10 en iguales condiciones, por la noche tiene alta temperatura que no es registrada con termómetro.

El día 11 tiene aliento fétido e hinchazón de ambas regiones sub-ángulo maxilares. A las 9 fué examinada por un médico, quien le inyectó 50.000 unidades de suero antidiftérico y a las 21 horas fué enviada por el mismo médico a este servicio.

Estado actual: facies pálidas, motilidad óculo-palpebral conservada. Pupilas regulares de igual tamaño, reacciona a la luz y distancia. Boca entreabierta, aliento fétido, lengua móvil saburral,

seca. Paladar blando y pilares anteriores edematosos, proyectados hacia adelante y la línea media donde se ponen en contacto. Exudado pseudo-membranoso en todo el paladar, blando y pilares anteriores, de color blanco grisáceo, espeso, de superficie irregular, adherente y coherente que al desprenderse hace sangrar la mucosa; llega el exudado hacia adelante, hacia el paladar duro y hacia afuera hasta la rama ascendente del maxilar inferior. Deglución normal, voz gangosa. Vomita todo lo que ingiere y a veces hay vómito biliar. Cuello de tipo proconsular por edema elástico que ocupa las regiones laterales e interior del cuello descendiendo hasta la mitad del esternón. En ambas regiones sub-ángulo maxilares se palpan tumoraciones del tamaño de un huevo de gallina, inmóviles. Tonos cardíacos normales, pulso 148, regular, igual, pequeño, hipotenso. Límite superior del hígado en el cuarto espacio intercostal; límite inferior a nivel del reborde costal; liso, indoloro. Fuerza muscular y tonismo disminuído, temblor generalizado.

Setiembre 14. Facies pálidas. Intensa epistaxis derecha y hemorragia laríngea; hemorragias conjuntivales del ángulo interno del ojo derecho y una sufusión sanguínea en el párpado inferior izquierdo. Vomita después de la ingestión de alimentos y agua. Fuliginosidades sanguinolentas en los labios y en la lengua. Abundantes coágulos que tapizan las amígdalas y pilares. Tonos cardíacos apagados, 140 pulsaciones por minuto, pulso igual, regular, pequeño, hipotenso. El borde inferior del hígado se palpa a dos traveses de dedo por debajo del reborde costal, liso, indoloro, de consistencia conservada. Intranquilidad, temblor generalizado. A veces delirio de acción y de palabra. Obnubilación. Deceso.

Un hecho interesante que conviene tener presente es la vinculación de vecindad de la primera enferma (F) y la segunda (V), pues ambas concurrían a la misma escuela y mismo grado y estaban sentadas en dos asientos contiguos.

Los caracteres bacteriológicos de las dos cepas (F) y (V) son los siguientes:

Morfología: bastones cortos. Presenta 3 a 5 corpúsculos meta-cromáticos coloreados por el método de PONDER modificado por KIN-YOUM. Las colonias son esféricas, muy negras, brillantes (agar sangre telurito). En agar sangre desfibrinada de conejo son esféricas de superficie y bordes lisos, blanco mate.

Fermentaciones: Siembra en medios de HISS y THIEL.

CUADRO N° 1

Azúcares	Medio de Hiss	Medio de Thiel
Glucosa	+	+
Maltosa	+	+
Sacarosa	—	—
Dextrina	+	+
Lactosa	—	—
Almidón	—	—

Estos caracteres permiten clasificar las cepas (F) y (V) como del tipo Mitis.

VIRULENCIA DE LAS CEPAS

Con todas las cepas que se aislan de los materiales enviados se realiza en forma sistemática la investigación de la virulencia utilizando el método de EAGLETON y BAXTER que consiste en inyectar por vía intradérmica 10.000.000 de bacterias en 0,1 cm³ a un cobayo de 300 gramos, al que se le inyecta cinco horas después 125 U. A. por vía peritoneal y tomando como testigo de la inoculación a otro cobayo inyectado 24 horas antes con 500 U. A. por vía peritoneal. Los resultados obtenidos hasta el momento de estudiar estas dos cepas fueron invariablemente los siguientes: todas las cepas, presumiblemente pertenecientes a la especie *C. diphtheriae*, aisladas por el método descrito por A. MANZULLO, dieron en el primer cobayo una lesión local constituída por una necrosis de 1,5 cm de diámetro sin que llegara nunca a morir un solo animal. Demás está decir que el animal testigo no presentaba lesión aparente local y tampoco ninguno murió. Cada cobayo sirvió para practicar doce pruebas. Cuando se inocularon entre otras diez, las emulsiones de las dos cepas (F) y (V), los cobayos del experimento y los testigos murieron en 24 horas con lesiones locales de difteria y con los signos del derrame pleural y la hemorragia de la cápsula suprarrenal que caracteriza la difteria experimental del cobayo.

Excluidos los casos de error y halladas las cepas que producían la muerte de los cobayos se llegó a conocer que éstos eran los de las enfermas (F) y (V) mencionadas a las que ligaba el vínculo del posible contagio entre ellas. La investigación del hecho sorprendente que mencionamos nos permitió recoger los siguientes datos:

El poder patógeno de las cepas (*) fué determinado por inyec-

ción a cobayos, por las vías subcutánea, intracutánea y peritoneal, y los resultados que están expuestos a continuación revelan: 1º un gran poder patógeno de la cepa, 2º ausencia de poder patógeno con 1.000 D.L.M. en la inyección peritoneal, 3º máximo del poder patógeno por vía subcutánea, 4º ausencia de poder patógeno por instalación ocular y vaginal.

Cultivo de 24 horas en agar suspendido en caldo.

CUADRO Nº 2

Número de bacterias presumiblemente inyectadas (*)	Cuenta de bacterias inyectadas por cultivo en placas	Vía de inoculación		
		Peritoneal	Subcutánea	Intracutánea
100.000	160.000	vive	+ en 1 día	+ en 1 día
10.000	12.300	vive	+ en 3 días	vive reac. +++
1.000	1.100	vive	+ en 4 días	vive reac. +++
100	150	vive	+ en 6 días	vive reac. ++
10	8	vive	vive	vive reac. ±

NEUTRALIZACIÓN DEL PODER PATÓGENO POR EL SUERO
ANTIDIPTÉRICO ANTITÓXICO

Las experiencias se hicieron variando la cantidad de suero y la cantidad de bacterias.

1º 10.000.000 de bacterias, cantidad usada en el método de EAGLETON y BAXTER, son inoculadas por vía subcutánea o intracutánea a cobayos que han recibido 24 horas antes 500, 2.500 y 5.000 U. A. de suero antidiftérico.

CUADRO Nº 3

Antitoxina inyectada	Cobayo inoculado por vía intradérmica	Cobayo inyectado por vía subcutánea
500	muere en 2 días	muere en 5 días
2.500	muere en 5 días	muere en 5 días
5.000	muere en 5 días	no muere en 5 días

(*) Como se han revelado ambas cepas idénticas, referimos sólo los datos de una de ellas, la cepa « F ».

2º 500 U. A., cantidad de suero usado en el método de EAGLETON y BAXTER, para el animal testigo, son inyectados 24 horas antes de la emulsión de 10.000, 100.000 y 1.000.000 de gérmenes, es decir aproximadamente 100, 1.000 y 10.000 D.L.M. por vía subcutánea, que equivalen a 1/1.000, 1/100 y 1/10 de la cantidad de bacterias usadas en la prueba de EAGLETON y BAXTER.

CUADRO N° 4

Número de bacterias inyectadas	Cobayo inyectado por vía intradérmica	Cobayo inyectado por vía subcutánea
10.000	sobrevive	sobrevive
100.000	sobrevive	muere en 3 días
1.000.000	muere en 2 días	muere en 2 días

Estas dos series de experimentos revelan: 1º que el suero es capaz de neutralizar el poder patógeno de la bacteria estudiada, 2º que con el aumento de la dosis inoculada la acción del suero no se pone de manifiesto, como se observa en general.

Esta falta de actividad del suero puede ser atribuída:

a) A la producción de una sustancia tóxica no neutralizable por el suero y capaz de dar lesiones macroscópicas de difteria.

b) A una propiedad de la bacteria de LÖEFFLER, de no ser paralizada por el suero antitóxico cuando la actividad patógena es extraordinariamente elevada, por ser muy grande el número de dosis mortales inoculadas, de modo que la agresión es tan masiva que el suero no resulta activo.

c) A una propiedad de la bacteria de LÖEFFLER de disponer de un antígeno de agresión capaz de permitir la multiplicación de la bacteria a pesar del suero antitóxico y como a medida que se multiplica la bacteria se produce toxina, ésta alcanza a neutralizar la antitoxina e intoxica al animal.

ACLARACIÓN DEL MECANISMO DE LA ACCIÓN PATÓGENA DEL GERMEN « F » EN PRESENCIA DE ANTITOXINA DIFTÉRICA

a) *Producción de toxina diftérica en caldo.* — Se cultiva el microbio en caldo peptonado especialmente preparado para la producción de una buena toxina diftérica, y al cabo de una incubación de seis a ocho días se prueba la toxicidad filtrando por bujía o matando por ácido fénico en la proporción de 5 ‰. Las características de las toxinas obtenidas corresponden a las que en general se obtienen de los microbios malos productores de toxina, con la

sola particularidad de que la toxicidad es menor que la que corresponde a la capacidad de neutralización de la antitoxina por toxinas frescas. En efecto la dosis mortal mínima para el cobayo está próxima a 1/10 de c. c. siendo siempre mayor de 5/100 y menor a las 2/10 de c. c. mientras que la dosis L_+ es de 1 c. c. De esto se deduce que el número de D.L.M. que constituyen un L_+ está comprendido entre 10 y 20, cifra que es extraordinariamente baja. Este hecho se confirma por el método de la saturación parcial de la antitoxina por adición sucesiva de la toxina del germen « F » y de $\frac{1}{2} L_+$ de una toxina patrón.

Cultivo en caldo con peptona PARKE DAVIS de cinco días de antigüedad. Se mata los gérmenes con fenol al 5 ‰ durante 24 horas. Se centrifuga durante 30' y del líquido sobrenadante se inyecta por vía subcutánea:

CUADRO N° 5

Toxina « F »	Cobayo N°	Resultado
0,5 c. c.	417	muere a los 3 días
0,1 c. c.	496	muere a los 4 días
0,05 c. c.	434	vive
0,01 c. c.	433	vive

CUADRO N° 6

Toxina « F » $\frac{1}{10}$	Suero	Cobayo N°	Resultado
1 c. c.	1 U. A.	354	muere en 3 días
0,5 c. c.	1 U. A.	349	vive
0,3 c. c.	1 U. A.	334	vive
0,1 c. c.	1 U. A.	375	vive

Media hora de contacto

CUADRO N° 7

Toxina « F » 6 días	Sol. Fisiol.	Suero antidif.	Toxina diftérica « 556 »	Resultado
0,5 c. c.	0,5 c. c.	—	—	muere en 2 días
0,5 c. c.	—	10 U. A.	—	vive
0,5 c. c.	—	10 U. A.	$\frac{1}{2} L_+$	muere en 1 día

CUADRO N° 8

Toxina « F » 8 días	Sol. Fisiol.	Suero antidif.	Toxina diftérica « 556 »	Resultado
0,1 e. c.	0,9 e. c.	—	—	muere en 3 días
0,25 e. c.	0,75 e. c.	—	—	muere en 2 días
0,5 e. c.	0,5 e. c.	—	—	muere en 1 día
0,5 e. c.	—	10 U. A.	—	vive
0,5 e. c.	—	10 U. A.	½ L ₊	muere en 2 días

Estas experiencias que no fueron continuadas, permiten decir: 1º que el germen en cuestión produce toxina diftérica, 2º que ésta es neutralizada por el suero antidiftérico, y 3º que la capacidad de saturación de la toxina es mayor que la deducida de su propiedad tóxica, cuando se tiene como cifras de comparación las de las toxinas producidas por microbios muy toxigénicos.

Un gran número de experimentos realizados con el objeto de exaltar la producción de la toxina en medios de cultivo diferentes, no condujo a ningún resultado interesante.

b) *Acción de la bacteria « F » sobre la antitoxina (in vitro).* — Con el objeto de averiguar si el germen « F » tenía la propiedad de destruir la antitoxina por algún mecanismo distinto de la saturación de la antitoxina por la toxina producida, se hizo una experiencia *in vitro*, que consistió en cultivar durante varios días en un caldo de difteria con una cantidad conocida de antitoxina diftérica y donde después de diferentes tiempos de incubación se determinó la antitoxina remanente por el método de la floculación. En este experimento se hizo comparativamente el estudio de la reducción de la antitoxina en el mismo medio con la misma cantidad de antitoxina utilizando cepas de bacilos toxígenos corrientes. Los resultados son homogéneos y en todos ellos se reduce de manera muy parecida el contenido de antitoxina siendo el máximo de reducción, de 60 Lf por e. c. para la cepa « F ».

En caldo que contiene 100 U. A. de suero antidiftérico por e. c. se siembran las cepas « F », Gravis, Mitis e Intermedio. A los cuatro y a los ocho días se hace medición por floculación del filtrado de los cultivos.

CUADRO N° 9

Cepa	Contenido de antitoxina por cc.	
	a los cuatro días	a los ocho días
« F »	40	40
Gravis	60	60
Mitis	60	60
Intermedio	60	60

Estos experimentos prueban que la bacteria « F » y las tres cepas utilizadas tienen prácticamente igual capacidad de saturar, o destruir, la antitoxina *in vitro*, a pesar de que su capacidad toxigénica en caldo es extraordinariamente diferente. Este hecho no puede ser utilizado como argumento esencial en la interpretación de las propiedades de la cepa « F », aunque es muy interesante y digno de ser estudiado con mayor número de cepas, y además sustenta la idea de que la cepa « F » a pesar de producir muy poca toxina es por lo menos tan capaz como una cepa toxigénica de neutralizar la antitoxina.

c) *Acción de la bacteria « F » sobre la antitoxina (in vivo).*— Si el microbio estudiado produce toxina diftérica neutralizable por el suero y si los animales inoculados con el germen y con suero mueren con lesiones de difteria, es verosímil que antes de producirse los fenómenos tóxicos y la muerte, deba desaparecer la antitoxina diftérica circulante en los animales inoculados. Esto fué observado en varios experimentos con cobayos inyectados previamente con suero; así por ejemplo un cobayo inyectado con 500 U. A. y 10.000.000 de bacterias, no contiene antitoxina circulante en el momento de la muerte ocurrida 24 horas después (menos de 1/100 de U. A. por c. c.); lo mismo sucede con otro cobayo inyectado con 2.500 unidades.

Con el objeto de hacer más severa la prueba se utilizan cobayos vacunados con 5 Lf de un toxoide activado que son reinyectados con 5 Lf de un toxoide simple al cabo de un mes. A la semana de esta inyección los cobayos tienen más de 10 U. A. por c. c.; inyectados con 1.000.000 de bacterias de la cepa « F » por vía subcutánea mueren de 1 a los 3 días de la inyección.

CUADRO N° 10

Cobayos inyectados con 1.000.000 de bacterias «F» el día 21-XI	Dosaje de antitoxina circulante		
	Resultado	Suero del día 21-XI	Suero del día 22-XI
282	muere en 1 día	más de 10 U. A.	1 U. A.
244	muere en 2 días	10 U. A.	1 U. A.
235	muere en 2 días	más de 10 U. A.	1/3 U. A.
214	muere en 3 días	más de 10 U. A.	3 U. A.

Es interesante ver el comportamiento de la antitoxina que se ha reducido a menos de la 1/10 parte o a menos de la 1/30 parte en los cobayos 282, 244 y 235. El último de los cobayos del experimento, el 214, que muere un día más tarde tiene el día 22, 3 U. A. por c. e. mientras los que sucumbieron uno o dos días antes tienen 1 ó 1/3 de unidad, como ya dijimos.

Este experimento prueba que por acción de la infección en el tejido celular subcutáneo tiene lugar una reducción extraordinaria de la antitoxina circulante, de modo que después de un tiempo no existe ya la protección de las células sensibles por la antitoxina lo que hace posible la agresión de ellas por la toxina.

Un experimento semejante fué realizado utilizando conejos en lugar de cobayos. Se inyecta por vía subcutánea 1.000.000 de bacterias de la cepa «F» a un conejo de un kilo y medio, y dos horas después por vía venosa se inyecta 1.000 U. A. de suero. A otro conejo se le inyecta solamente 1.000 U. A. de suero por vía venosa (el peso de este conejo es también de un kilo y medio).

CUADRO N° 11

Valor antitóxico del suero a distintos tiempos de la inyección de las bacterias

	12 h.	20 h.	28 h.	36 h.	44 h.	56 h.	72 h.
Conejo N° 560 1.000 U. A. por vía venosa y 1.000.000 de bacteria cepa «F» .	mas de 5	5	3	1/10	1/10	1/30	muere con lesiones diftéricas
Conejo N° 514 1.000 U. A. por vía venosa	5	3	3	3	3	1	—

Esta experiencia tiene igual significado que las realizadas con cobayos y demuestra que la cepa «F» se multiplica en el tejido celular de los conejos neutralizando la antitoxina hasta producir la intoxicación mortal.

II

De los experimentos relatados, resulta evidente que la cepa «F» tiene la propiedad de producir toxina diftérica de manera muy mediocre, tal como sucede con casi todas las bacterias del tipo Mitis, que tiene en cambio una actividad reductora de la antitoxina *in vitro* bastante marcada y no inferior a la de los microbios llamados toxigénicos y por último que *in vivo* reduce de manera sorprendente la antitoxina inyectada a los cobayos y a los conejos y también la producida por inmunización activa en los cobayos. Es decir que existe una actividad disociada *in vitro* e *in vivo* muy característica, que permite dar una explicación bastante simple del comportamiento particular del germen.

Queda sin embargo por demostrar cuál es la causa que diferencia a este microbio de los otros que son paralizados por el suero. Como hipótesis podemos suponer que la bacteria de LÖEFFLER que se aísla corrientemente, cuando se encuentra en los tejidos del cobayo en presencia de antitoxina no tiene sino una limitada capacidad de invasión que al ser paralizada por las defensas del organismo no produce otra cosa que una reacción local, pues la pequeña cantidad de toxina diftérica que produjo es neutralizada por la antitoxina circulante. En cambio la cepa «F» tiene la particular propiedad de multiplicarse en el organismo del cobayo y del conejo a pesar de la antitoxina diftérica, que solo neutraliza la toxina, y multiplicándose y produciendo toxina termina por neutralizar o destruir la antitoxina, después de lo cual intoxica las células sensibles. Esto equivale también a decir que el germen tiene un antígeno de agresión que le es particular de modo que se podría producir por inmunización, un suero con la propiedad de neutralizar el antígeno de agresión. Este suero impediría la pululación del germen y por consiguiente no tendría lugar la neutralización de la antitoxina y la intoxicación del animal.

El experimento fué realizado inmunizando caballos por vía subcutánea con microbios vivos y luego con microbios muertos por vía venosa, de acuerdo al protocolo que sigue.

CUADRO N° 12

Antígeno y vía	Equino N°	Fechas y valores antitóxicos				
		27-XII	5-I	26-I	27-II	25-III
Anatoxina por vía subcutánea 200 c. c.	6519	200				
Anatoxina por vía subcutánea 400 c. c.	6746	100				
<i>Bacterias vivas</i> cepa «F» vía subcutánea: 8 inyecciones 10 ⁶ hasta 2.10 ¹¹	6519		100	50		
bacterias	6746		50	25		
<i>Bacterias muertas</i> : por vía venosa 10 inyecciones de cepa «F» de 6.10 ⁹ hasta 10 ¹² bacterias	6519				40	
	6746					

COMPARACIÓN DEL PODER PROTECTOR DE TRES SUEROS

A) Suero mezclado de los caballos 6519 y 6746 sangrados el día 17-XII (suero antitóxico) 150 U. A. por c. c.

B) El suero de los mismos animales sangrados el 5-I (suero antitóxico y antimicrobiano en el comienzo de la inmunización por vía subcutánea) 75 U. A. por c. c.

C) Suero antidiftérico concentrado (antitóxico) de 1.500 U. A. por c. c.

Se inyectan cobayos por vía subcutánea con 10.000.000 de bacterias de la cepa «F» y dos horas después el suero antidiftérico por vía peritoneal.

CUADRO N° 13

Suero	U. A. inyectadas	Resultado
A	150	muere en 2 días
	750	muere en 2 días
B	75	muere en 3 días
	375	vive
C	500	muere en 2 días
	2.500	muere en 3 días

Ya este experimento prueba la aparición de la actividad neutralizante del poder patógeno de la cepa «F», por inmunización con

bacterias vivas, pues 375 U. A. producen la neutralización que no existe con 2.500 U. A. de un suero antitóxico.

NEUTRALIZACIÓN COMPARADA DEL PODER PATÓGENO DE DISTINTAS CEPAS
POR UN SUERO ANTITÓXICO Y UN SUERO ANTITÓXICO
ANTIMICROBIANO

Se emplean tres cepas de bacterias: Gravis, Intermedio y la cepa « F » cuyo poder patógeno está representado por las siguientes cifras:

CUADRO N° 14

	D. L. M.
Gravis A. 708	1×10^8
Intermedio (P. Toronto)	1×10^8
Cepa « F »	1×10^3

Los sueros utilizados son dos:

a) Suero antitóxico concentrado de 1.500 U. A. por c. c.

b) Suero antitóxico antimicrobiano constituido por la mezcla de los sueros 6519 y 6746 de la sangría del 27-II de 40 U. A. por c. c.

Se inyectan cobayos con 50 D.L.M. de cada una de las tres cepas y dos horas después se inyectan distintas cantidades de suero por vía peritoneal.

CUADRO N° 15

Suero	U. A. inyectadas	Cepa	Resultados
Suero antitóxico	200	Gravis	vive
	200	Intermedio	muere en 3 días
	200	« F »	muere en 2 días
Suero antitóxico, antimicrobiano (anti « F »)	200	Gravis	vive
	200	Intermedio	muere en 3 días
	200	« F »	vive
	20	Gravis	vive
	20	Intermedio	muere en 3 días
	20	« F »	vive
	2	Gravis	muere en 1 día
	2	Intermedio	muere en 1 día
	2	« F »	muere en 1 día

Este experimento prueba que la cepa « F » puede ser neutralizada por una cantidad relativamente reducida de antitoxina cuando se

encuentra junto a ella anticuerpos antibacterianos específicos. Agrega además otro hallazgo cual es el de la falta de neutralización de la cepa Intermedia (P. Toronto) por el suero antitóxico y por el suero mixto de la cepa «F». Esto parecería indicar que el fenómeno observado en la cepa «F» debe ser general aunque menos evidente que el presentado por la cepa «F».

Un hecho aparentemente contradictorio con la propiedad atribuída a la cepa «F» de producir mucha toxina *in vivo*, es el de la disminución del valor antitóxico observado en el curso de la inmunización con bacterias vivas. A pesar de tener la prueba de que el microbio estudiado produce toxina diftérica por las lesiones y por la neutralización de la antitoxina, se hizo la prueba cruzada de inmunizar un caballo con caldo en que se cultivó la bacteria. Al cabo de cuatro semanas en las que se inyectó pequeñas cantidades del antígeno, el suero contenía una cantidad de antitoxina representada por 50 unidades antitóxicas por e. e.

RESUMEN

1. — El cultivo de exudado faríngeo de dos casos de difteria permitió aislar un microbio de caracteres de *C. diphtheriae* de tipo Mitis, cuyo poder patógeno para el cobayo es muy elevado.

2. — El suero antitóxico preparado de la manera habitual con la toxina de la cepa PARK WILLIAMS N° 8, neutraliza con gran dificultad la acción patógena del germen aislado; los animales sucumben con lesiones macroscópicas de difteria sin septicemia.

3. — La antitoxina circulante de los animales (cobayos y conejos) inyectados preventivamente con suero antidiftérico se reduce hasta desaparecer por acción del microbio estudiado, cuando se le inyectó por vía subcutánea; igual sucede con la antitoxina de los animales activamente inmunizados.

4. — El microbio produce poca cantidad de toxina tal como sucede con los gérmenes del tipo Mitis. Cultivos en caldo, que contiene antitoxina diftérica, reduce a ésta de igual manera que la cepa PARK WILLIAMS y sin que haya apariencia de destrucción de antitoxina.

5. — La inyección de cultivos en caldo, muertos por fenol, produce en el caballo elevación del título antitóxico para la toxina diftérica de la cepa PARK WILLIAMS.

6. — La inmunización por las vías subcutánea y venosa, con gérmenes vivos, de caballos previamente inmunizados con la toxina cepa PARK WILLIAMS, permite obtener un suero de valor antitóxico menor que el de los mismos animales al iniciar la inmunización con

bacterias, pero ese suero adquiere la propiedad de neutralizar la acción patógena del microbio estudiado con una cantidad de antitoxina relativamente pequeña.

El mismo suero neutraliza en manera análoga a una cepa Gravis que es también neutralizada por el suero antitóxico de la cepa PARK WILLIAMS; en cambio una cepa Intermedia no es neutralizada su acción patógena ni por el suero antitóxico de la cepa PARK WILLIAMS ni por el antitóxico antimicrobiano de la cepa « F ».

CONCLUSIONES

1. — El poder patógeno experimental del *C. diphtheriae* (cepas « F » y « V ») no está determinado exclusivamente por su capacidad toxigénica. Existe posiblemente un antígeno de agresión que no es paralizado por la antitoxina y que permite la pululación local del microbio patógeno.

2. — Esa acción patógena, no neutralizable prácticamente por el suero antidiftérico, está determinada por la suma del antígeno de agresión que permite la pululación del germen y la génesis de toxina que al neutralizar la antitoxina circulante, puede matar a los animales.

3. — Es posible neutralizar el antígeno de agresión por un suero antimicrobiano específico preparado con las cepas estudiadas.

4. — La existencia de un antígeno distinto de la toxina, no es exclusivo de las cepas « F » y « V » estudiadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- J. S. ANDERSON, F. C. HAPPOLD, J. W. MCLEOD y J. C. THOMSON, *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Tomo 34, año 1931, pág. 667.
- J. S. ANDERSON, K. E. COOPER, F. C. HAPPOLD y J. W. MCLEOD, *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Tomo 36, año 1933, pág. 169.
- J. NICHOLAS, *Comptes Rendues de la Soc. de Biol.* Tomo 48, año 1896, pág. 817.
- DURAND y GUERIN, *Comptes Rendues de la Soc. de Biol.* Tomo 84, año 1921, pág. 980.
- EAGLETON y BAXTER, *The Journal of Hygiene*. Tomo 22, año 1923-24, pág. 107.
- JEAN ORR EWING, *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Tomo 37, año 1933, pág. 345.
- D. T. ROBINSON y A. L. P. PEENEY, *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Tomo 43, año 1936, pág. 403.
- C. C. OKELL, *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Tomo 29, año 1929-30, pág. 309.
- S. F. DUDLEY, *The Lancet*. Febrero de 1934, N° 6, Vol. CCXXVI, pág. 299.