

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLÓGICO
DEL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Las precipitinas del suero anticarbuncloso

Por A. Sordelli, P. Beltrami, C. Harispe y C. Franceschi

En el año 1910 Ascoli y Valenti ⁽¹⁾ publicaron el método de diagnóstico biológico de la infección carbunclosa conocida generalmente con el nombre de método de Ascoli. La propiedad precipitante fué encontrada en un número pequeño de sueros de animales inmunizados, pues solo 3 sueros entre 30 contenían precipitinas en grado suficiente para ser utilizables.

En un trabajo posterior Ascoli ⁽²⁾ comunicó haber hallado un mayor número de animales productores (9 en 40). Entre los animales examinados había caballos, asnos, vacas y ovejas.

Estos datos bastan para revelar que la producción de un suero precipitante para el *B. anthracis*, es en cierto modo obra del azar y que depende en grado principal del individuo inmunizado.

Respecto del antígeno, Ascoli ⁽³⁾ dice que el factor principal reside en los cuerpos bacilares y no en la virulencia de la cepa usada. Sirven, en consecuencia, los cultivos atenuados o avirulentos con los que se pueden evitar las dificultades y accidentes comunes en la inmunización con bacilos vivos virulentos.

En lo que se refiere a la vía de inmunización y de la preparación del antígeno no existen indicaciones precisas en ninguno de los trabajos mencionados. Parece que la vía utilizada con mejor resultado fué la venosa (Ascoli, *loc. cit.* ⁽²⁾), pues en los protocolos publicados la inmunización se hizo por vacunación, luego por inoculación subcutánea de carbunco y por fin por inyección venosa.

Schütz y Pfeiler ⁽⁴⁾ * en el año 1912 obtuvieron sueros precipitantes por inmunización de conejos, ovejas, vacas, caballos y asnos. Parece esta última especie la más apropiada. En ese trabajo aconsejan el empleo de cultivo fresco medianamente virulento, a semejanza de Ascoli. Primordial importancia atribuyen a la naturaleza de la cepa, pero a pesar de ello, las variaciones individuales de los animales productores son muy grandes. La vía de inoculación que les diera mejor resultado fué la venosa.

En el Instituto Bacteriológico, Kraus y Beltrami tentaron la preparación de sueros precipitantes con resultados inciertos o negativos.

Estos antecedentes nos condujeron a admitir que la preparación del suero precipitante obedecía a la obra de la casualidad o bien requería condiciones especiales de los antígenos o de la técnica de inmunización.

En el Laboratorio de Investigaciones Veterinarias de Potsdam dirigido por R. Standfuss, uno de nosotros tuvo oportunidad de conocer el método de diagnóstico por precipitación (variante de Müssemeier) y la técnica de preparación de suero precipitante, utilizado en ese método, siendo posible repetir los ensayos en Buenos Aires y corroborar la verdad de aquella comunicación verbal. (Ver también Francke, Standfuss, Schnauder y Müssemeier ⁽⁵⁾ y Standfuss y Schnauder ⁽⁶⁾).

Dos características importantes tiene el método utilizado en Potsdam: a) Las cepas que se emplean deben formar cápsulas y conservarlas en condiciones determinadas; b) el antígeno que se inyecta debe estar constituido por bacilos virulentos (?) y capsulados.

a) ELECCION DE LA CEPA.—El germen al cabo de 12 días de cultivo en agar suero a 42°, debe poseer cápsulas en abundancia. La cepa que tiene esta característica parece conservarla por mucho tiempo y es capsulada siempre que se la cultive en un medio con proteínas nativas.

Once cepas de *B. anthracis*, de reciente aislamiento algunas, y otras conservadas en el laboratorio desde mucho tiempo, se siembran en caldo y se inoculan a conejos. La virulencia se exalta en todas por varios pasajes (de 4 a 15). La D mortal en el conejo de todas ellas es menor de 1/100.000 de ansa.

Cultivadas en agar simple, ninguna de ellas presenta cáp-

* Este trabajo solo lo conocemos por un extracto.

sulas, usando como colorante, Giemsa de Grüber diluido, y como fijador alcohol metílico.

El agar-suero se prepara con agar común al 2 % con peptona P. y Davis pH 8.4 al que se añade suero normal de caballo en la proporción de 1 parte por cada 3 de agar.

Los tubos sembrados se parafinan para impedir la desecación y se colocan a 42° por 12 días.

Los resultados están consignados en el cuadro I, donde puede observarse que la propiedad de dar cápsulas no es constante en todas las cepas. La cepa Will es la que las ha dado en todos los casos y fué elegida por esta razón para la inmunización.

CUADRO I.

C E P A	Diciembre	Enero	Marzo	Abril
Peral	+	-	++	++
Gall. I.	+	+++	-	-
Ganañ.	+	-	-	-
Bernam.	+++	+++	-	+++
Gall. III.	+	+++	++	+
Will.	+	++	+++	+++
Rom. I.	-	+	+++	+
M. Paz.	-	+	-	+
Gall. II.	-	+++	+++	+
Rom.	-	+	-	++
Porret.	-	-	-	-

b). El antígeno se prepara cultivando en agar-suero (3 partes por 1) por 24 horas a 37°. Se suspende en agua fisiológica y se hacen así emulsiones cuya riqueza en gérmenes se determina por opacidad.

La dificultad de obtener coloraciones que permitieran diferenciar claramente la cápsula, del cuerpo de la bacteria, nos obligó a ensayar varias técnicas hasta encontrar una que nos satisfizo. Consiste en una coloración doble, con la fucsina de la técnica de Huntoon y con azul de metileno hidro-alcohólico con ácido fénico (Kühne). Pueden colorearse extendidos fijados o no y también los obtenidos según el método de Huntoon con nutrosa para la coloración de cápsula. Se hace actuar la fucsina por 20", se lava y luego se tiñe con el azul por 3 o 4 segundos. Se lava. Si el color es muy rojo aún, se añade nuevamente azul por 1 o 2 segundos. Si fuera muy azul se añade fucsina. Y así se pueden en tres o cuatro tentativas hallar el color conveniente. Los bacilos aparecen azulados y sus cápsulas rojas.

La mayor parte de las bacterias de la cepa Will, presentan en esta condición una cápsula bien formada y fácilmente coloreable por el método descrito (fig. 1).

La propiedad que tiene el *B. anthracis* de formar cápsulas en los medios con proteínas nativas, es conocida desde hace tiempo (Kodama, Ottolenghi, Olivero, Ciani, citados en Kolle y Wassermann 1913, Handbuch der Path, Mikroorganismen y en Lustig, 1922, Malattie infettive del uomo e degli animali),



Fig. 1

y ha sido utilizada en el método que describimos con el fin de modificar los caracteres antigénicos de la cepa. Por otra parte es un hecho corrientemente aceptado que la presencia de las cápsulas en el *B. anthracis* le comunica propiedades especiales relacionadas con el poder patógeno, la virulencia y el valor antigénico.

No analizaremos en este trabajo la relación entre los caracteres antigénicos del *B. anthracis* y su cápsula, pero debemos hacer presente que en todo momento hemos utilizado cultivos capsulados. La cepa "Will" elegida en 1926 para la inmunización ha conservado hasta hoy esa propiedad. (*).

* En el curso de nuestras investigaciones se mantuvo la virulencia por pasaje por conejo. La D. M. M. para cobaya (300 grs.) por vía subcutánea ha sido aproximadamente de $1/1.000.000$ cm.³ de una suspensión de 5000 millones por cm.³ de cultivo de 24 horas en agar-suero. Para el conejo de 1000 grs. por vía subcutánea ha sido 10 veces mayor; es decir, de $1/100.000$ de cm.³ de una suspensión de 5000 millones por cm.³

II

Se han utilizado para la inmunización caballos y mulas. La inmunidad básica fué conferida inoculando por vía subcutánea Vac. I y Vac. II del Instituto Bacteriológico.

La primera vacuna es solo patógena para el ratón blanco; la segunda lo es también para la cobaya y no para el conejo. Cuando tuvimos certeza de que la inmunidad de los animales era suficientemente sólida fueron inyectados con la cepa virulenta por vía intravenosa.

Las reacciones generales han sido a veces muy violentas escalofrías y elevación de la temperatura. Esta ha permanecido alta de uno a tres días. La disminución de peso y el mal estado general de los animales de la primera serie, hicieron necesario un descanso. Después de que se hubieron restablecido soportaron muy bien las dosis altas de la misma cepa.

En los cuadros siguientes consignamos los protocolos de inmunización de las dos series de animales inmunizados.

P R I M E R A S E R I E

Fecha	Antígeno inoculado	Dosis	Vía
25 - XI - 25	Vacuna I ^a .	1 cm. ³	Subcutánea
2 - XII - 25	» 1 ^a .	2 cm. ³	»
9 - XII - 25	» II ^a .	5 cm. ³	»
16 - XII - 25	» II ^a .	10 cm. ³	»
23 - XII - 25	» II ^a .	20 cm. ³	»
30 - XII - 25	» II ^a .	30 cm. ³	»
7 - I - 26	» II ^a .	60 cm. ³	»
14 - I - 26	» II ^a .	100 cm. ³	»
20 - I - 26	» II ^a .	100 cm. ³	»
27 - I - 26	Carbunco Ber.	1 M *	Intravenosa
3 - II - 26	» »	2 M	»
11 - II - 26	» »	10 M	»
19 - II - 26	» »	50 M	»
24 - II - 26	» »	200 M	»
4 - II - 26	» »	600 M	»
10 - III - 26	» »	2000 M	»
17 - III - 26	» »	4000 M	»
24 - III - 26	» Will.	6000 M	»
8 - IV - 26	» »	8000 M	»
15 - IV - 26	» »	12000 M	»
23 - IV - 26	» »	16000 M	»
29 - IV - 26	» »	16000 M	»
11 - V - 26	Sangría de 6 lit.

* Estas cifras representan el número de 1000 millones de gérmenes inoculados, así p. ej. 400 M equivalen a 400 mil millones de gérmenes.

PROTOCOLO DE LA SEGUNDA SERIE

En esta serie las dosis mayores fueron inoculadas en dos días seguidos con el fin de evitar los accidentes que suelen presentarse por inoculación masiva por vía venosa. Al iniciar la inmunización de estos animales en cada semana hemos hecho una desensibilización ⁽¹⁾ dividiendo las dosis en una pequeña que se inyecta primero y una mayor que se inocula horas más tarde; al día siguiente se inocula toda la dosis en una sola operación.

La dosis máxima alcanzada en esta serie ha sido de 14.000 M por semana, que es un poco inferior a la máxima que se inoculó en la anterior serie.

Un problema que no hemos estudiado todavía es el de la variación del contenido de anticuerpos precipitantes en los días subsiguientes a la inoculación, pues siguiendo una vieja práctica de nuestro Instituto sangramos los animales después del 10° día. En verdad, para el método usado actualmente creemos que dicho plazo es un poco largo, pues las bacterias desaparecen de la sangre en un tiempo menor que 10 días.

SEGUNDA SERIE

Fecha	Antígeno inoculado	Dosis	Vía
10 - VIII - 27	Vac. I Instituto	1 cm. ³	Subcutánea
17 - VIII - 27	Vac. I Instituto	5 cm. ³	»
24 - VIII - 27	Vac. II Instituto	1 cm. ³	»
1 - IX - 27	» » »	5 cm. ³	»
8 - IX - 27	» » »	10 cm. ³	»
14 - IX - 27	» » »	30 cm. ³	»
23 - IX - 27	» » »	50 cm. ³	»
30 - IX - 27	» » »	100 cm. ³	»
6 - X - 27	Carbunclo Will.	5 M	Vía intravenosa
13 - X - 27	» »	10 M	»
21 - X - 27	» »	15 M	»
28 - X - 27	» »	25 M	»
3 - XI - 27	» »	50 M	»
9 - XI - 27	» »	100 M	»
18 - XI - 27	» »	200 M	»
25 - IX - 27	» »	400 M	»
2 - XII - 27	» »	800 M	»
9 - XII - 27	» »	800 M	»

(Continúa)

(1) Este método usado con todos los antígenos bacterianos, inoculado por vía venosa, fué empleado por consejo del Dr. Bachmann y ha dado siempre resultados excelentes.

(Continuación)

Fecha	Antígeno inoculado	Dosis	Vía
15 - XII - 27	» »	1600 M	»
27 - XII - 27	» »	1600 M	»
3 - I - 28	» »	800 M	»
4 - I - 28	» »	1600 M	»
12 - I - 28	» »	1000 M	»
13 - I - 28	» »	2000 M	»
19 - I - 28	» »	1200 M	»
20 - I - 28	» »	2400 M	»
26 - I - 28	» »	1200 M	»
27 - I - 28	» »	2400 M	»
2 - II - 28	» »	1500 M	»
3 - II - 28	» »	3000 M	»
9 - II - 28	» »	2000 M	»
10 - II - 28	» »	4000 M	»
16 - II - 28	» »	2000 M	»
17 - II - 28	» »	4000 M	»
23 - II - 28	» »	2000 M	»
24 - II - 28	» »	4000 M	»

III

La acción precipitante de los sueros fué determinada por la técnica de superposición del suero y el extracto (**). Los extractos fueron obtenidos: unos por maceración en frío, y otros por cocción y con ambos los resultados fueron comparables. En los cuadros siguientes puede verse la variación del poder precipitante en el curso de la inmunización.

Primera serie de animales inmunizados por vía venosa con cultivo de la cepa Will

Nº del animal productor.	Inmunización comenzada en fecha.	Sangría de fecha	Precipitinas	Sangría de fecha	Precipitinas
Mula 230	Noviembre 1925	Mayo 11-1926	O	—	—
» 231	» 1925	» »	+	Septiembre 1926	+++
» 232	» 1925	» 11- »	+	» 1926	+
» 702	» 1925 *	» 5- »	+++	Mayo 1926	+++
» 282	Mayo 1926	Septiem. 14-1926	+	Diciembre 1926	+++
» 283	» 1926	» »	O	Diciembre 1926	+

(*) Este caballo estaba inmunizado desde el año 1924 y desde el mes de noviembre de 1925 se le inyecta por vía venosa cultivo de carbunclo capsulado.

(**) Se emplean tubos de 3 mm. de diámetro interno y 22 milímetros de largo. La boca tiene forma de embudo. Son estos los mismos tubos usados en Potsdam.

Segunda serie de animales inmunizados por vía venosa con cultivo de la cepa Will

N.º del animal	Inmunización comenzada en fecha	Sangría de fecha	Precipitinas	Sangría de fecha	Precipitinas	Sangría de fecha	Precipitinas	Sangría de fecha	Precipitinas
533	10 Agosto 1927	8 Sep. 1927	0	2 Enero 1928	+	12 Mayo 1928	+	27 Abril 1928	++++
55	» » »	» » »	0	» » »	+	» » »	+	» » »	++++
538	» » »	» » »	0	» » »	+	» » »	+	» » »	++++
51	» » »	» » »	0	» » »	0	» » »	++	» » »	++++
560	» » »	» » »	0	» » »	0	» » »	++	» » »	+++

En estos cuadros se pone de manifiesto que las precipitinas aparecen muy lentamente y que todos los animales (mulas y caballos) han llegado a tener un suero precipitante siempre que la inmunización se haya prolongado un tiempo suficientemente largo. En ambas series los sueros han sido muy precipitantes después del séptimo mes de inmunización (**).

IV

Ascoli ⁽²⁾ indica como método conveniente para la obtención del precipitinógeno la maceración de los órganos con cloroformo y la extracción ulterior con solución fisiológica a temperatura ambiente. Para la rutina y solo por comodidad aconseja el método de la termoprecipitación.

Schütz y Pfeiler ⁽⁴⁾ hallan que el método de la extracción clorofórmica de Ascoli da extractos muy activos y Erban ⁽⁷⁾ corrobora el hallazgo de Ascoli.

En el año 1924 Francke, Standfuss, Schnauder y Müssmeier ⁽⁵⁾ estudian la posibilidad de aplicar el método de Ascoli a las pieles frescas, saladas o secas, aconsejando para la obtención de los extractos un método semejante al usado por Uhlenhut (ver Kolle y Wassermann) para la diferenciación de carnes por precipitación. El método de Ascoli, que ya había sido empleado

(**) Actualmente procuramos establecer si la producción de precipitinas es posible con gérmenes capsulados y avirulentos inoculados por vía venosa o por vía subcutánea, habiendo podido comprobar que ya en el curso de la inmunización aparecen precipitinas. Falta establecer si su concentración alcanzará un límite suficientemente alto para permitir utilizar los sueros.

para la investigación de pieles de animales muertos de carbunco por Schütz y Pfeiler, Pfeiler y Neumann, Negroni, etc. (citados en ⁽⁵⁾) es según Francke, etc., de menor sensibilidad que el por ellos aconsejado. Este método consiste en macerar a la temperatura de 8° - 15°, durante varias horas, 1 gramo de piel cortada en pequeños trozos, en 5 cm.³ de solución fisiológica con 5 o/oo de fenol. La centrifugación de este macerado permite obtener extractos completamente claros. Este método es sin duda fácilmente utilizable para la piel y los órganos que no den extractos muy coloreados, pues en los casos que el color del extracto fuera muy intenso, la lectura es difícil o imposible.

Standfuss, Schnauder ⁽⁶⁾ hallan sin embargo que los extractos de todos los órganos son utilizables y que la intensidad del color no molesta para la ejecución de la reacción de Ascoli.

Erbán ⁽⁷⁾ Cernaianu ⁽⁸⁾ confirman que los extractos preparados de acuerdo con la técnica de Francke, Standfuss, Schnauder y Mussemeier ⁽⁵⁾ y Standfuss y Schnauder ⁽⁷⁾ son excelentes para el diagnóstico del carbunco por el método de Ascoli.

Estos últimos autores investigan órganos de los que se han tomado trozos pequeños conservados envolviéndolos en papel de filtro o secante y encuentran que aún con un extracto de 0.2 grs. de órgano seco en 10 cm.³ de solución fisiológica fenicada se obtiene una reacción de precipitación.

Las muestras de sangre recogidas también sobre papel secante se conservan perfectamente.

Quiroga ⁽⁹⁾ aconseja este mismo método de conservación para ejecutar luego la técnica de las cocto-precipitinas.

Nuestros experimentos se han realizado en condiciones un poco distintas de las indicadas por aquellos autores, pues hemos empleado piel y órganos de animales muertos por carbunco, desecados en pocas horas en el vacío sulfúrico. Por esta circunstancia que aleja nuestros experimentos de los que se realizan en la rutina diaria del diagnóstico del carbunco no podemos aplicar directamente nuestras conclusiones, aunque muy verosimilmente pudieran serlo.

Hemos comparado la sensibilidad del método de Francke, Standfuss, Schnauder y Mussemeier con la de la cocto-precipitación de Ascoli, siguiendo para la preparación de los extractos la técnica siguiente:

1° Extractos fríos (Francke, etc.), 1 gramo de órgano se macera por 24 horas en la heladera con 5 cm.³ de solución

fisiológica fenicada al 5 o/oo. El líquido que está turbio se lo debe aclarar por centrifugación. Los extractos de hígado y bazo son a veces muy coloreados, lo que dificulta la observación del anillo zonal.

2° Extractos hervidos (Ascoli). A 1 gramo de órgano se añaden 5 cm.³ de solución fisiológica y se hierven por 5'. Se filtra por filtro estéril.

Estos ensayos fueron hechos con piel, bazo e hígado de conejos y cobayas normales y muertos por una infección carbunclosa.

La comparación de estos métodos ha revelado una concordancia muy grande del poder precipitante de distintos sueros con ambos extractos no diluïdos.

Suero	Extracto cocido 1/5 en sol. fisiológica sin diluir.	Extracto frio 1/5 en sol. fisiológica - - fenol 5 o/oo sin diluir.
81	++	++
82	++	++
84	+	+
85	++	+
86	++	++
87	+	++
88	+	+
90	—	—
92	++	++
93	++	++
94	++	++
96	+	+

Los controles fueron negativos en todos los casos, tanto de los sueros carbunclosos con órganos de animales normales o muertos por infección de *V. septico* o de *B. Chauvoei*, como de órganos de animales muertos por carbunco, con sueros normal, antimeningocócico, antipestoso y antitífico.

La especificidad debió en realidad haberse buscado para extractos de órganos que contuvieran bacterias de especies afines al carbunco p. ej., *B. anthracoides* (Hüppe Wood) *B. anhracis similis* (Mac Farland 1898) *B. anthracoides* (Bainbridge 1903).

Aunque en la práctica estos casos se presentan muy raras veces y por lo tanto carecen de importancia para la investigación de rutina, desde el punto de vista teórico reviste interés para la diferenciación del carbunco avirulento de especies semejantes, lo que no es siempre un problema fácil.

Cuando un suero tenía poder precipitante para el extracto de un órgano lo poseía en igual forma para los otros (piel, bazo, hígado). Siempre la piel del conejo y de la cobaya han dado reacción positiva. Francke, Standfuss, Schnauder y Müssemeier⁽⁵⁾ solo encuentran reacciones positivas con extractos de piel de conejo cuando está impregnada con una cantidad apreciable de sangre. Este probablemente ha sido el caso que se nos ha presentado siempre, pues la piel ha dado invariablemente la misma reacción que el hígado y el bazo.

Esta concordancia de los resultados como la que mencionamos en la página anterior no significa que el contenido del precipitinógeno sea igual en todos los extractos, pues un gran exceso de aquel no modifica apreciablemente el tiempo de aparición del anillo (la aparición entre 1' y 10'') ni la intensidad de la reacción.

Para ver si ambos métodos (cocción o extracción fría) dan extractos igualmente ricos de precipitinógeno, hicimos una comparación de ambos extractos diluidos en grado igual, determinando para cada caso el límite de aparición de la reacción.

Los experimentos revelan que en los extractos por maceración fría hay una concentración de precipitinógeno 8 a 16 veces mayor que en los extractos obtenidos por cocción.

Límite de reacción con extractos diluidos
Bazo de cobaya*

Dilución	Suero serie 92		Suero serie 91		Suero serie 84	
	Extracto frío	Extracto cocido	Extracto frío	Extracto cocido	Extracto frío	Extracto cocido
1/1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/2	+++	++	+++	+++	+++	++
1/4	++	+	++	++	++	+
1/8	++	+	++	+	++	+
1/16	+	+	++	+	+	+
1/32	+	—	+	—	+	—
1/64	+	—	+	—	+	—
1/128	+	—	+	—	+	—
1/256	—	—	—	—	—	—

* Resultados idénticos se obtienen con hígado de cobaya.

Esta diferencia puede ser debida a una menor solubilización del precipitinógeno en el procedimiento de la cocción o a una destrucción del precipitinógeno por la ebullición. (*).

La prueba de que se trata de una destrucción del precipitinógeno fué facilmente hallada, pues los extractos obtenidos en frio se atenúan considerablemente por ebullición.

VARIACIÓN DEL PODER PRECIPITANTE DE UN EXTRACTO POR EBULLICIÓN

1 parte de hígado de cobaya + 5 partes de sol. fisiológica
Se extrae 24 horas a temperatura laboratorio $\pm 18^\circ$. Una parte se hierve (extracto hervido); otra parte se usa tal cual (extracto frio).

Dilución del extracto	SUERO 850		SUERO 851	
	Extracto frio	Extracto hervido	Extracto frio	Extracto hervido
1/1	+++	+++	+++	++
1/2	+++	++	++	+
1/5	+++	+	++	+
1/10	++	+	+	—
1/20	+	—	+	—
1/40	+	—	+	—
1/100	+	—	—	—

En este cuadro puede observarse que la atenuación del poder precipitante es del mismo orden que en el protocolo anterior (pág. 341), lo que indica claramente que la cocción destruye parte del precipitinógeno. La sensibilidad de la reacción de precipitación se reduce por lo menos al 1/5, lo que disminuye la posibilidad de descubrir una infección carbunculosa cuando el material reúne condiciones poco favorables.

(*) Atribuir esta diferencia o disminución de la cantidad de precipitinógeno, es como puede suponerse una posibilidad solamente, pues no están excluidas las de la variación del estado coloidal y de la concentración de otras sustancias que la cocción precipita o destruye.

Estas conclusiones, aunque basadas en resultados obtenidos con material de carbunco experimental permiten, por la regularidad y grado de las diferencias observadas, aconsejar el método de la extracción en frío propuesto por Francke, Standfuss, Schnauder y Müssemeier.

El precipitinógeno fué hallado también en los cultivos de carbunco en caldo y en agar. Fué también observada una disminución de la intensidad de la reacción por cocción del extracto.

Tanto las cepas que son fuertemente capsuladas, en los cultivos de agar suero, como las que lo son poco o nada, presentan reacciones de intensidad igual o comparable.

Precipitación del extracto de *B. anthracis* cultivados en caldo por 24 horas a 37°.

Cepa	SUERO 82		SUERO 83		SUERO 86	
	Extracto frío	Extracto hervido	Extracto frío	Extracto hervido	Extracto frío	Extracto hervido
Ganad.	++	+	++	+	++	+
Pom.	++	+	++	+	++	+
M. Paz	++	+	++	+	++	+
Bernam.	++	+	++	+	++	+
Peral.	++	+	++	+	++	+
Will.	++	+	++	+	++	+

Los extractos obtenidos por centrifugación de un macerado durante 24 horas a temperatura ambiente de *B. anthracis* crecidos en agar simple, dieron resultados idénticos con los sueros 82, 83 y 86.

De acuerdo con estos experimentos parece que la cápsula no fuera un órgano esencial para la formación o solubilización del precipitinógeno del *B. anthracis*.

V

La precipitación de los extractos carbunclosos por sueros específicos diluidos en solución fisiológica tienen lugar también; pero con la diferencia de que ya con diluciones pequeñas del suero el fenómeno no se presenta. Interviene sin duda como causa

principal la dificultad de conseguir una zona de separación entre un extracto y el suero diluido, pues si al suero se lo diluye no ya en solución fisiológica sino con un suero normal, el fenómeno tiene una atenuación semejante a la observada por dilución del extracto.

Si este hecho fuera exacto, en la práctica significaría una economía considerable de suero, que para un número muy grande de pruebas tiene importancia.

Precipitación con suero precipitante diluido en suero normal

Suero 533. — Extracto en frío de hígado de conejo.

Dilución del Suero	Dilución del extracto						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1/1	++++	+++	+++	++	+	+	—
1/2	+++	+++	++	+	+	±	—
1/4	+++	++	+	+	+	—	—
1/8	++	+	+	+	—	—	—
1/16	+	+	±	±	—	—	—
1/32	+	±	—	—	—	—	—
1/64	—	—	—	—	—	—	—

Suero 851

Dilución del Suero	Dilución del extracto						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1/1	++++	+++	++	+	+	+	—
1/2	+++	++	++	+	+	±	—
1/4	++	++	+	+	—	—	—
1/8	+	+	±	—	—	—	—
1/16	+	—	—	—	—	—	—
1/32	—	—	—	—	—	—	—
1/64	—	—	—	—	—	—	—

Estos datos revelan que con un suero precipitante bien activo se pueden obtener reacciones de precipitación muy intensas con diluciones de $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ en suero normal, y que la sensibilidad de la reacción disminuye proporcionalmente a la dilución del suero.

En la práctica probablemente los extractos que se obtienen contienen el antígeno en concentración grande, lo que permitirá usar sueros diluidos a la mitad o la cuarta parte sin hacer perder especificidad ni sensibilidad a la reacción.

VI

En el estudio de las propiedades de estos sueros anticarbunclosos hemos hallado que por dilución en agua destilada precipitan abundantemente las euglobulinas. (?)

Este fenómeno, como es sabido, se presenta en los sueros normales con muy poca intensidad.

Durante la inmunización de los animales con *B. anthracis* es posible ver en todos los sueros un aumento de la labilidad por el agua destilada.

Este hecho tiene más interés cuanto que en el precipitado de globulinas se encuentran anticuerpos específicos. En esta ocasión nos ocuparemos solamente de las precipitinas. La técnica para precipitar las globulinas es la siguiente:

Se diluyen 10 cm.³ de suero en 90 cm.³ de agua destilada saturada con CO₂. Se deja la mezcla por 6-24 horas a temperatura ambiente y se centrifuga. El precipitado se disuelve en 2 cm.³ de solución fisiológica ⁽¹⁾. La solución de albúminas y pseudoglobulinas se evapora rápidamente a baja temperatura (Faust o vacío sulfúrico) hasta el volumen de 10 cm.³. Quedan así las globulinas insolubles concentradas 5 veces y las albúminas y pseudoglobulinas reducidas al mismo volumen que el suero primitivo. Ambos líquidos tienen una concentración protéica semejante, lo que permite un estudio de su poder precipitante en condiciones comparables.

Precipitación del extracto puro de hígado de cobaya carbuncloso con suero 850-851 y sus fracciones de globulinas y de albúmina + pseudoglobulinas.

Diluciones del extracto	Suero 850	Globulinas 850	Pseudoglobulinas + albúminas 850	Suero 851	Globulinas 851	Pseudoglobulinas + albúminas 851
1/1	++++	++++	—	+++	+++	—
1/2	+++	+++	—	++	++	—
1/5	+++	+++	—	++	++	—
1/10	++	++	—	+	++	—
1/20	+	+	—	+	++	—
1/40	+	+	—	+	+	—
1/100	—	—	—	—	—	—

En este cuadro puede observarse que la totalidad de las precipitinas ha quedado en las globulinas insolubles en agua destilada, careciendo la fracción de albúminas pseudoglobulinas de todo poder precipitante.

El límite de la reacción por dilución del extracto es prácticamente el mismo en el suero total que en las euglobulinas a pesar de que éstas tengan una concentración de anticuerpos 5 veces mayor que el suero original. Pfeiler y Drescher (citados en Erban) han hallado un hecho semejante, pues el título del suero precipitante no se modifica por concentración en el vacío ni por dilución pequeña.

COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS EUGLOBULINAS Y LOS SUEROS PRECIPITANTES

Destrucción por el calor.—Las globulinas de los sueros 850-851 obtenidas por precipitación en agua destilada y CO₂ y disueltas en solución fisiológica hasta llegar a una concentración de 4-5 % pierden totalmente su actividad precipitante por calentamiento a 60° durante 30'. Igual comportamiento fué observado con los sueros totales 850 y 851. La atenuación del poder precipitante o su destrucción se observa, según la literatura, a una temperatura comprendida entre 56° y 60°.

Comparación de las propiedades de las euglobulinas y los sueros precipitantes.

20 cm.³ de suero 851 se diluyen en 180 cm.³ de agua destilada saturada con CO₂; a las cuatro horas se centrifuga y el sedimento de las globulinas se disuelve en 5 cm.³ de solución fisiológica. (1 cm.³ equivale a 4 cm.³ del suero primitivo).

Como extractos se usan: una maceración en frío de hígado de conejo muerto de carbunco y el mismo extracto hervido por 5'.

Dilución del extracto	Globulinas del suero 851		Suero 851
	Extracto frío	Extracto cocido	Extracto frío
1/1	++++	++++	++++
1/2	++++	++++	+++
1/4	++++	++++	++
1/8	++++	++	+
1/16	+++	+	+
1/32	++	—	+
1/64	+	—	±
1/128	—	—	—

Los controles con extractos de hígado normal no dan ninguna reacción.

La reacción de precipitación aparece con las globulinas con gran nitidez y muy rápidamente y los anillos son muy intensos hasta en las diluciones de 1/8 - 1/16 en las que el suero 851 da una reacción apenas positiva. Esta diferencia debida sin duda a la mayor concentración de anticuerpos y a la mayor labilidad de las euglobulinas, no aparece tan claramente si se considera en vez de la intensidad de la reacción, el límite por la dilución del extracto, pues solo hay en las dos series una diferencia de grado en la reacción para la dilución 1/64 que es el límite para ambas.

La cocción del extracto reduce también la actividad del precipitinógeno en la proporción de 4 a 1, hecho que por otra parte era lógico que se presentara.

LÍMITES DE PRECIPITACIÓN POR DILUCIÓN DE EXTRACTO, DEL SUERO
Y DE LAS GLOBULINAS PRECIPITADAS POR AGUA.

Se comparan con un mismo extracto el límite de precipitación por dilución de este extracto y por dilución del suero 851 en suero normal y por dilución de las euglobulinas del mismo suero en el mismo suero normal.

a) Suero 851 diluido en suero normal 854 y extracto de hígado de conejo extraído en frío con solución fisiológica fenicada al 5 o/oo durante 60 horas.

Dilución del suero 851 en suero normal 854	Dilución del extracto en solución fisiológica						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1/1	+++	+++	++	+	+	+	±
1/2	+++	+++	+	+	+	+	±
1/4	++	++	+	+	±	-	-
1/8	+	+	±	±	-	-	-
1/16	+	±	-	-	-	-	-
1/32	-	-	-	-	-	-	-
1/64	-	-	-	-	-	-	-

b) Las globulinas obtenidas del suero 851 son diluidas en suero normal 854, de tal manera que corresponden las diluciones con las del suero del cual fueron preparadas las euglobulinas.

Se usa el mismo extracto de (a).

Dilución de las globulinas	Dilución del extracto						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1/1	+++	+++	+++	++	+	+	±
1/2	+++	++	++	+	+	±	±
1/4	+++	++	+	+	±	±	-
1/8	++	+	+	+	-	-	-
1/16	±	+	-	-	-	-	-
1/32	-	-	-	-	-	-	-
1/64	-	-	-	-	-	-	-

La comparación de los resultados de este protocolo con los del anterior hace resaltar de manera clarísima que las propiedades precipitantes del suero carbuncoso 851 están contenidas íntegramente en las globulinas insolubles.

RESUMEN

La inmunización de caballos o mulas por vía venosa con *B. anthracis* capsulado y cultivado en agar suero, permite obtener de todos los animales un suero con poder precipitante específico. La elevación del título precipitante se hace con lentitud y requiere la inoculación de cantidades grandes de gérmenes. Aunque en nuestras experiencias no hayamos hecho controles con cepas sin cápsula, puede decirse por la constancia de los resultados y la actividad de los sueros obtenidos, que las cepas capsuladas constituyen un antígeno óptimo para la preparación del suero anticarbuncoso precipitante. Respecto de la importancia que tienen la virulencia del germen y la vía de inoculación a los animales, nuestros experimentos no nos permiten tener aún una opinión definitiva.

Los sueros que tienen poder precipitante lo han manifestado tanto con los antígenos obtenidos por maceración de órganos carbuncosos en agua fisiológica fenicada, como con los obtenidos por ebullición en solución fisiológica. Igual acontece con los extractos de *B. anthracis* cultivados en caldo o en agar, hervidos o no.

La reacción se manifiesta intensamente con los extractos obtenidos por maceración de una parte de órgano con cinco partes de solución fisiológica. La reacción decrece por dilución del extracto hasta desaparecer en diluciones que varían de 1/64 hasta 1/200, es decir, en macerados desde 1 parte de órgano por 300 de fluido hasta 1 parte por 1000 de fluido.

Los extractos obtenidos por cocción son mucho menos ricos en precipitinógeno, que los obtenidos por maceración en frío, pues si los primeros dan la reacción de diluciones de 1/10, los segundos precipitan con diluciones hasta de 1/100. Igual acontece si se comparan un extracto obtenido en frío, con el mismo extracto hervido. No hemos establecido si el fenómeno se debe a una destrucción del precipitinógeno, a su precipita-

ción o a la alteración del estado coloidal del líquido por la cocción.

Esta diferencia de actividad tan marcada permite preveer que el método de Francke, Standfuss, Schnauder y Müssemeier es mas sensible que el de la termoprecipitación. Este método, como es sabido, fué aconsejado por Ascoli solo por razones prácticas, pues él mismo encontró que los extractos clorofórmicos frios tenían más actividad.

En la comparación del límite de reacción por dilución del suero precipitante o del extracto, se encontró que con pequeñas diferencias la atenuación y desaparición de la reacción sigue una ley semejante para ambos. La dilución del suero, por razones obvias debe ser hecha en un suero normal.

La dilución en agua destilada de un suero carbuncloso preparado de la manera indicada en este trabajo revela una gran inestabilidad de sus globulinas, que son precipitadas en proporción muy superior a la que se observa en los sueros preparados por inyección intravenosa de otras bacterias. Esta labilidad aparece recién cuando la inmunización está muy avanzada y crece hasta que ésta llega al máximo. Estas apreciaciones no son fundadas en experimentos cuantitativos y por lo tanto no pretendemos decir que exista una proporcionalidad entre el contenido de precipitinas y la cantidad de globulinas que precipitan por dilución por agua.

Este hecho adquiere un relieve mayor si se tiene en cuenta que la totalidad de las precipitinas se separa por dilución del suero a la décima parte en agua destilada saturada de anhídrido carbónico. Estas euglobulinas, que solo son una quinta o sexta parte del total de las proteínas del suero, se comportan de manera idéntica al suero primitivo. Así por ej.: tienen igual labilidad por calentamiento; tienen un mismo límite de precipitación que el suero de donde provienen y disueltas en un suero normal transforman a este en un suero de propiedades precipitantes iguales al suero carbuncloso original.

CONCLUSIONES

1° Con *B. anthracis* capsulado inoculado por vía venosa al caballo es posible obtener con certeza un suero anticarbuncloso precipitante muy activo y específico.

2º La totalidad de las precipitinas de este suero está contenida en las globulinas precipitables por dilución en agua destilada saturada de anhídrido carbónico.

3º La comparación de los extractos obtenidos por maceración en frío con los preparados por cocción revela una mayor actividad para los primeros.

LITERATURA

1. — A. ASCOLI Y VALENTI. Biologische Milzbrand diagnose. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten u. Hygiene der Haustiere*, t. VII, pág. 13. Junio 1910 (citado en Bull. Ins. Pasteur 1910, t. VIII, pág. 652).
2. — A. ASCOLI. Die präzipitationsdiagnose bei Milzbrand. *C. Bakteriologie*, t. 58, p. 63, 1911. A. Ascoli, Biologische Milzbranddiagnose mittels der Präzipitationmethode D. M. Wo, t. 37, pág. 353, 1911.
3. — A. ASCOLI. Der Ausbau Meiner Präzipitation Reaktion zur Milzbrand diagnose. *Z. für Immunitätforschung*, t. 11, pág. 103, 1911.
4. — SCHÜTZ U. PFEILER. Der Nachweis des Milzbrandes mittels der Präzipitationmethode. (Referido en *C. f. Bakt.*, t. L. V. p. 162, 192, Referata) Original en *Archiv für wissenschaftliche u. praktische Tierheilkunde*, t. 38, pág. 207 y 311, 1912.
5. — FRANCKE STANDFUSS SCHNAUDER U. MÜSSEMEIER. Untersuchungen über der Milzbrand Nachweis an Häuten mittels der Präzipitation. *Archiv für wissenschaftliche und Prakt. Tierheilkunde*. t. 51, p. 530, 1924.
6. — STANDFUSS SCHNAUDER. Das Kaltauszuverfahren bei der Milzbrand Präzipitation. *Centralblatt für Bakteriologie*. t. 95, pág. 61, 1925.
7. — ERBAN. Über den Nachweis des Milzbrandes an Häuten mit Hilfe des präzipitations verfahrens. *Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamte*. t. 57, página 445, 1926.
8. — CERNAIANU. Réaction de précipitation d'Ascoli en présence d'un extrait préparé à froid pour le diagnostic du charbon bacteridien. *C. R. Soc. Biol.* t. 94, página 897, 1926.
9. — QUIROGA. Método práctico y simple de recoger material para el diagnóstico del carbunco. *Folleto del Ministerio de Agricultura*. República Argentina.