

## Las propiedades del suero anticarbuncloso

### Los anticuerpos protectores

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

#### I

Desde nuestros primeros ensayos procedimos para probar la actividad del suero con una cepa virulenta a pesar de que la opinión de la mayor parte de los autores ha sido favorable al uso de vacunas y de gérmenes de escasa virulencia. No creemos actualmente que la virulencia tenga importancia, pero cuando decidimos el uso del germen de virulencia muy alta, quisimos al mismo tiempo que imitar la infección natural de las especies sensibles, no ser pasibles de la crítica hecha a los que usan vacunas para las experiencias de medición del suero anticarbuncloso. Fué asimismo elegida la cobaya como especie de prueba, especie muy sensible a la infección experimental por vía subcutánea y que no es incriminada como el conejo, al que se le supone una resistencia individual muy variable y a veces muy grande.

Después de muchas tentativas para conseguir una determinación aproximada de la dosis mortal del carbunco (cepa Will), terminamos por adoptar la siguiente: Cultivo de 24 a 30 horas en agar suero a 35° - 37°. Suspensión en caldo hasta que la opacidad corresponde a la de 5.000 millones de gérmenes por cm.<sup>3</sup>. Dilución en caldo común (peptona P. D. o Martin pH - 8.4) hasta alcanzar la concentración que se busca. Para la dilución tomamos la precaución indispensable de cambiar de pipeta a cada dilución, pues de lo contrario el número de gérmenes que se inyecta no puede ser siquiera sospechado. La dilución final se inyecta en el volumen de 1 cm.<sup>3</sup>. El uso de la solución fisiológica

fué descartado desde muy pronto por la irregularidad de los resultados. Nuestra atención fué dirigida a este detalle por haber observado que en el caso de los anaerobios (especialmente *B. welchii*) sucede un hecho análogo. Brocq, Rousseau, Staub y Urbain <sup>(1)</sup> aconsejan el uso de caldo porque la solución fisiológica es tóxica para el *B. anthracis*. Sin tener en cuenta esta explicación, el hecho observado por nosotros, coincide con la afirmación de estos autores publicada ya en 1926.

La determinación de la D. M. M. para la cobaya ha revelado que siempre con 1/1.000.000 de cm.<sup>3</sup> de la emulsión de 5.000 millones se produce una infección mortal por *B. anthracis*.

a). Las primeras experiencias que hiciéramos fueron por inoculación del suero por vía subcutánea y 24 horas después, el virus por la misma vía. Con esta técnica observamos una diferencia evidente entre los sueros normales y un suero inmune. El protocolo siguiente tiene resumidas las experiencias así realizadas. Se inyectan cobayas de 250 - 280 gramos, con suero por vía subcutánea y 24 horas después se inyecta 1 cm.<sup>3</sup> de dilución 1/50.000 en caldo de una suspensión de carbunco Will de 5.000 millones por cm.<sup>3</sup> Prácticamente la dosis inyectada equivale a 20 mínimas mortales.

En el protocolo siguiente están resumidas tres experiencias hechas cada una de ellas con series dobles de cobayas para cada dosis, practicadas en los días 23-VIII, 1-IX y 7-IX de 1927.

Una experiencia igual y con resultados iguales fué hecha con vacuna Pasteur II en la dosis de 1/100 de cm.<sup>3</sup>

Dosis de suero	Suero normal de caballo.		Suero normal de bovino.		Suero inmune S. 92.	
	Viven	Mueren	Viven	Mueren	Viven	Mueren
0.1 cm. <sup>3</sup>	0	6	0	6	0	6
0.25 cm. <sup>3</sup>	0	6	0	6	0	6
0.50 cm. <sup>3</sup>	0	6	1	5	1	5
1 cm. <sup>3</sup>	0	6	1	5	2	4
2 cm. <sup>3</sup>	0	6	0	6	1	5
4 cm. <sup>3</sup>	0	6	0	6	6	0
8 cm. <sup>3</sup>	0	6	1	5	6	0

CONTROLES.

1 mueren }  
0 viven } cm. 1/50.000

4 mueren }  
0 viven } cm. 1/1.000.000

Teniendo en cuenta el número de animales inyectados con cada suero, con lo que las variaciones individuales se atenúan, es evidente que la acción del suero normal de caballo es nula y la del suero de bovino muy pequeña. La del suero específico es intensa. La única observación que cabría es que solo se manifiesta con dosis muy altas de suero.

La necesidad de inyectar una cantidad tan considerable de suero bajo la piel produce fenómenos de inflamación no despreciables que pueden modificar por alteración local, las condiciones de la infección hecha 24 horas después. Por esta razón en todas las experiencias realizadas posteriormente utilizamos la vía peritoneal para inocular el suero.

Los resultados fueron en estos casos más evidentes, pues ya pudimos encontrar sueros que con dosis de 1 cm.<sup>3</sup> protegían la cobaya contra la infección, de 20 dosis mortales de carbunco Will.

b). La objeción de que una cepa modificada por pasajes en el conejo podía ser causa de los resultados favorables obtenidos, nos hizo comparar con el mismo suero la cepa Will, la vacuna II Pasteur y carbunco de campo, muy virulento, conservado por cultivo en agar, sin pasaje alguno.

En el protocolo siguiente están resumidos los resultados que revelan de manera clara que la protección por el suero inmune no es un fenómeno que aparece solo para razas atenuadas o modificadas por pasaje sino que se observa también para cepas de gran virulencia.

La determinación de virulencia de las cepas dió los siguientes valores:

Will	D. M. M.	=	$1 \times 10^{-6}$
Li	D. M. M.	=	$1 \times 10^{-7}$
Vac. II	D. M. M.	=	$1 \times 10^{-4}$

Las dosis que se inculan son de  $2 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  y  $2 \times 10^{-2}$  de cada una de ellas respectivamente, 24 horas después de que las cobayas han sido inyectadas con suero por vía intraperitoneal.

Cepa	Dosis de suero en cm. <sup>3</sup>	Resultado
Will	1	+
	2	0
	4	0
Li.	1	0
	2	0
	4	0
Vac. II	1	+
	2	0
	4	0

La repetición de estas experiencias y la observación de los animales por largo tiempo parece que revelara que la protección se confiere más difícilmente para la vacuna que para las cepas virulentas. Intervienen sin duda dos factores importantes, que son el número de gérmenes inyectados y la gran esporulación que se observa en la vacuna II. No pretendemos explicar los fenómenos observados sinó tan solo anotar que no solo hay diversidad de virulencia sinó otros factores que pueden tener importancia mayor.

c). Las experiencias hechas con la cepa Will, que es capsulada en la casi totalidad de sus gérmenes, reproduce desde el momento de la inoculación la condición que muchos autores exigen para que exista la invasión carbunclosa y por lo tanto la infección.

Este hecho nos hizo suponer que el suero debía tener acción sobre la infección con sangre u órganos virulentos y que sería posible tentar con alguna probabilidad, experimentos de curación de la infección carbunclosa experimental.

Las experiencias de protección para sangre y órganos virulentos fueron hechas con la técnica que a continuación se describe. Se inyectaron varias cobayas por vía subcutánea con dosis distintas de carbunco Will. En el momento de la muerte de una de ellas se saca el bazo y se le tritura; se suspende en solución fisiológica, se le filtra por algodón y se diluye en caldo. Se inyectan cobayas con dosis diferentes y se determina la dosis mortal mí-

nima. Obtenida esta cifra se repite la experiencia suponiendo una virulencia igual e inyectando 20 dosis mortales mínimas.

La variación grande de la virulencia hizo que varias tentativas fracasaran por falta o por exceso de virus. La experiencia definitiva dió el resultado consignado en el siguiente protocolo, habiéndose inoculado una dosis de virus superior a 20 dosis mínimas mortales.

Suero	Vol. de suero	Resultado
S. 82	2	0
	2	0
533	4	0
	4	0
113	4	0
	4	0
Ma	4	+
	4	+
Li	4	+
	4	+

Este experimento prueba que la infección de una cobaya con sangre virulenta puede ser paralizada por un suero específico. Llama la atención que solo los sueros preparados con la misma cepa usada en la infección hayan tenido esa propiedad. Respecto de los sueros Ma. y Li no sabemos qué vía de inmunización se ha usado ni la virulencia de los antígenos empleados.

Protección de cobaya para la infección con sangre virulenta ha sido encontrada por Brocq, Rousseau, Staub y Urbain <sup>(1)</sup>. Takima Matsumoto <sup>(4)</sup> con un suero "antiagresínico" ha podido proteger conejos contra sangre virulenta.

Con estos resultados podía creerse que si la adaptación del *B. anthracis* es un factor decisivo para la infección, el suero que protege contra un virus tomado directamente de un animal, debe poder paralizar la infección si se inocula simultáneamente o después del virus.

Los experimentos siguientes se hacen en la forma habitual con cultivo en agar suero de la cepa Will suspendida en caldo.

	Dosis de virus	Dosis de suero	Resultado	Control con 4 cm. <sup>3</sup> de suero normal de bovino
Suero + Virus Mezcla in vitro	1/250.000 (2 D. M. M.)	4	0	+
		4	0	+
	1/25.000 (20 D. M. M.)	4	0	+
		4	+	+
Suero intraperitoneal y virus subcutáneo	1/250.000 (2 D. M. M.)	4	+	+
		4	+	+
	1/25.000 (20 D. M. M.)	4	+	+
		4	+	+
Virus subcutáneo y 2 horas después suero intraperitoneal	1/250.000 (2 D. M. M.)	10	+	—
		10	+	—
		10	+	—
		10	+	—
		10	+	—
		10	+	—

Aunque estos resultados no apoyen aquella suposición son insuficientes para negar la verdad de la primera parte del enunciado, pues aparte de la adaptación de los gérmenes interviene de una manera preponderante la dosis de virus. Si se tiene en cuenta que la absorción de los anticuerpos del suero en el peritoneo y la llegada al sitio de la inoculación (tej. sub.) se realiza en un tiempo relativamente largo, es posible que tenga lugar, no sólo una adaptación, sino también un aumento grande de la dosis de virus por la multiplicación de gérmenes.

La mezcla de suero y cultivo ha revelado que el *B. anthracis* puede ser neutralizado. La actividad del suero es comparable a la del mismo suero inyectado por vía peritoneal el día anterior. Esta propiedad la utilizó Méndez para medir la actividad de los sueros <sup>(3)</sup> determinando la dosis que prolonga la vida de los animales 6 a 8 horas con relación a los testigos sin suero.

d). El comportamiento de los conejos ha sido en un todo semejante al de las cobayas. La actividad del suero ha sido más

fácil de revelar y las dosis que protegen son en general menores. Es probablemente un animal de prueba que equivale a la cobaya para este fin, a pesar que su sensibilidad es menor y probablemente más irregular.

Los protocolos que siguen se refieren a la protección por inyección de suero por vía peritoneal y venosa y a la neutralización de un cultivo por mezcla *in vitro*.

#### SUERO SERIE 82

Suspensión de carbunco Will en caldo de acuerdo con la técnica general. La dosis mínima mortal está comprendida entre  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-5}$ . Se usan 20 veces  $1 \times 10^{-5}$ , es decir,  $1 \text{ cm.}^3$  de una dilución de 1/5000 que se inyecta por vía subcutánea.

Vol. de suero	Vía venosa	24 horas después	Resultado	Controles mueren con $1 \text{ cm.}^3$ de 1/100.000
2	»	$1 \text{ cm.}^3$ Will 1/5000	0	
5	»	»	0	
10	»	»	0	
Vol. de suero	Vía intraperitoneal.	24 horas después		
2	»	$1 \text{ cm.}^3$ Will 1/5000	0	
5	»	»	0	
10	»	»	0	

#### NEUTRALIZACIÓN DEL CULTIVO POR MEZCLA Y VALORES DE PROTECCIÓN DE LOS MISMOS SUEROS

Se mezcla suero con  $1 \text{ cm.}^3$  de emulsión de carbunco Will al 1/5000 en caldo y se inyecta la mezcla después de 15' a conejos por vía subcutánea (conejos de 1 kg.)

Otro lote de conejos recibe suero por vía peritoneal y 24 horas después la misma dosis de virus por vía subcutánea.

Experiencias de protección				Experiencias de neutralización		
Caballo	Dosis de suero		Resultado	Resultado	Inyección de 1/5000 de Will con suero	Caballo
533	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ cm.}^3 \\ 2 \text{ cm.}^3 \end{array} \right\}$	24 horas después inyección con 1/5000 de carbunco Will	+	0	1 cm. <sup>3</sup>	533
			0	—	—	
535	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ cm.}^3 \\ 2 \text{ cm.}^3 \end{array} \right\}$		+	0	1 cm. <sup>3</sup>	535
			0	—	—	
538	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ cm.}^3 \\ 2 \text{ cm.}^3 \end{array} \right\}$		+	0	1 cm. <sup>3</sup>	538
		0	—	—		
541	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ cm.}^3 \\ 2 \text{ cm.}^3 \end{array} \right\}$	+	0	1 cm. <sup>3</sup>	541	
		0	—	—		
560	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ cm.}^3 \\ 2 \text{ cm.}^3 \end{array} \right\}$	0	0	1 cm. <sup>3</sup>	530	
		0	—	—		

10 controles para el experimento de protección y 5 para el de neutralización con las mismas dosis de suero normal, mueren rápidamente y en forma igual que los animales con virus solo.

Esta experiencia prueba que la actividad del suero para neutralizar *in vitro* el poder patógeno del carbunco es mayor que la que revela para proteger al mismo animal cuando el suero se inyecta por vía peritoneal.

e). Hemos estudiado también la variación del poder protector del suero durante la inmunización, midiendo cada sangría poco tiempo después de hecha y luego todas al mismo tiempo para que las cifras fueran más comparables. Las experiencias se hicieron por protección en cobayas y por protección y neutralización en conejos.

La técnica utilizada es la misma que hemos mencionado repetidas veces.

La elevación del valor protector o neutralizante es lenta y ha requerido cerca de ocho meses para llegar al máximo. La pri-

mera sangría del mes IX - 27 es de animales vacunados con vacuna I y II. La segunda del mes I - 28 es de los mismos después de haber recibido dosis grandes de carbunco virulento y la tercera del mes IV - 28, después de 11 inyecciones con una dosis total de 600 cm.<sup>3</sup>. de 100.000 millones por cm.<sup>3</sup>

PODER PROTECTOR DEL SUERO INMUNE

Cobayas de 300 gs.

Suero peritoneal.

24 horas después *B. anthracis* (cepa Will) suspendido en caldo.

1 cm.<sup>3</sup> de la dilución 1/50.000=20 D. M. M.

Caballo 533	Dosis de suero	Resultado
Sangría IX-27	2	+
	2	+
	4	+
	4	+
Sangría I-28	2	+
	2	+
	4	0
	4	0
Sangría IV-28	1	+
	1	+
	2	0
	2	0
Suero normal de caballo	2	+
	2	+
	4	+
	4	+
Suero normal de bovino	2	+
	2	+
	4	+
	4	+

Protección por el suero anticarbuncloso y 24 horas después 1/5000 de Will. (Suero en inyección peritoneal a conejos de 1000 gs.)

Caballo	Sangría IX - 27		Sangría 2-1-28		Sangría 30-IV-28	
	1 cm. <sup>3</sup>	2 cm. <sup>3</sup>	1 cm. <sup>3</sup>	2 cm. <sup>3</sup>	1 cm. <sup>3</sup>	2 cm. <sup>3</sup>
533	+	+	+	+	+	0
535	+	+	+	0	+	0
538	+	+	+	0	+	0
541	+	+	+	+	+	0
560	+	+	+	+	+	0

Neutralización por mezcla *in vitro* de un cultivo de carbunclo Will (1/5000) por 1 cm.<sup>3</sup> de suero (conejos de 1000 gs.)

Caballo	Sangría 1-X-28	Sangría 2-1-28	Sangría 30-IV-28
533	+	+	0
535	+	0	0
538	+	+	0
541	+	+	0
560	+	+	0

Todos los experimentos hasta ahora referidos revelan que el suero anticarbuncloso tiene propiedades específicas que lo diferencian completamente del suero normal y que el suero de un mismo animal durante la inmunización adquiere aunque lentamente una actividad cada vez mayor.

## II

En la comunicación anterior referimos el hecho de la separación de las globulinas del suero anticarbuncloso por dilución de agua y CO<sub>2</sub>. Las mismas globulinas y el resto soluble pseudoglobulinas+albúminas fueron estudiadas bajo el aspecto de sus propiedades de protección o neutralización de la infección carbunclosa.

a). *Fraccionamiento del suero por agua.* En el experimento protocolizado más abajo se demuestra que por acción del agua se precipitan totalmente las sustancias activas.

Sueros 850 y 851 provenientes de mezcla de sangrías del 30-IV-27. Se diluyen al 1/10 por agua saturada de CO<sub>2</sub> y se espera al día siguiente para separar el precipitado. Este se disuelve en un volumen de solución fisiológica igual al del suero primitivo. La parte sobrenadante que contiene las albúminas y las pseudoglobulinas, se concentra en vacío rápidamente ( $\pm 30'$ ) a temperatura inferior a 35° y hasta tener una concentración doble del suero primitivo. Con estos tres líquidos, suero primitivo, globulinas insolubles y pseudoglobulinas más albúminas, se inyectan cobayas por vía intraperitoneal y a las 24 horas se infectan en la forma habitual. Las cifras indicadas en la columna *Dosis de suero* son referidas a volúmenes de suero original y las cifras que están entre paréntesis son las cantidades de proteínas que se han inyectado (N.  $\times 6.25$ ). Las determinaciones de proteínas fueron hechas por el doctor Modern.

*Fraccionamiento del suero por dilución con agua destilada. Poder de protección para cobayas.*

		Dosis de sueros		Resultado
Suero total 850		5 cm. <sup>3</sup>	(0.32)	0
		5 cm. <sup>3</sup>	(0.32)	0
Suero total 851		(0.30)	5 cm. <sup>3</sup>	0
		(0.30)	5 cm. <sup>3</sup>	0
Pseudoglobulinas + albúminas 850		10 cm. <sup>3</sup>	(0.53)	+
		10 cm. <sup>3</sup>	(0.53)	+
Pseudoglobulinas + albúminas 851		(0.47)	10 cm. <sup>3</sup>	+
		(0.47)	10 cm. <sup>3</sup>	+
Globulinas insolubles 850		5 cm. <sup>3</sup>	(0.05)	0
		5 cm. <sup>3</sup>	(0.05)	0
Globulinas insolubles 851		(0.06)	5cm. <sup>3</sup>	0
		(0.06)	5cm. <sup>3</sup>	0

Los resultados son tan claros que no necesitan comentario especial revelando que las globulinas insolubles contienen toda la actividad protectora del suero anticarbuncloso.

b). Demostrada la ausencia total de poder protector en las pseudoglobulinas + albúminas, estudiamos la actividad de las globulinas insolubles, tanto en el experimento de protección como de neutralización en cobayas y en conejos.

Se precipitan los mismos sueros 850 y 851 y se diluye el precipitado en un volumen igual a 1/5 del suero primitivo. La concentración de proteínas en las globulinas insolubles es igual a la del suero primitivo (pues el total de proteínas está constituido por cuatro partes que no precipitan y 1 que precipita por acción del agua).

*Valor de protección de las globulinas insolubles. El suero se inyecta por vía intraperitoneal y el virus 48 horas más tarde por vía subcutánea.*

Suero serie	Vol. de globulinas cm. <sup>3</sup> .	Cobaya	Virus 24 horas después	Resultado
851	{ 0.1	843	1 cm. <sup>3</sup> al 1/25000	0
	{ 0.2	412	»	0
	{ 0.5	499	»	0
850	{ 0.1	407	»	0
	{ 0.2	434	»	0
	{ 0.4	409	»	0
Control virus		457	«	+ 48 horas

La cantidad mínima de proteína inyectada es para el suero 851 de 6 miligramos y para el suero 850 de 5 miligramos.

*Valor de neutralización de las globulinas precipitadas por agua. Después de media hora de contacto de las globulinas con 20 D. M. M. de virus "Willburn" se inyecta la mezcla a cobayas por vía subcutánea.*

Vol. de globulinas	Cobaya N°	Observaciones
851 { 0.2 cm. <sup>3</sup> 0.5 cm. <sup>3</sup> 1 cm. <sup>3</sup>	498	0
	439	0
	411	0
850 { 0.2 cm. <sup>3</sup> 0.5 cm. <sup>3</sup> 1 cm. <sup>3</sup>	408	0
	454	0
	474	0
Control	457	+ 48 horas

*Poder de neutralización de las globulinas precipitadas por agua para el conejo. Se mezclan las globulinas con 1 cm.<sup>3</sup> de una suspensión de carbunco "Willburn" en caldo al 1/5000 que equivale a 20 D. M. M.*

Volumen de globulinas cm. <sup>3</sup>	Corresponde a cm. <sup>3</sup> suero primitivo	Virus	Conejo N.º	Observaciones	Controles
850	0.5	1/5000	5603	0	1/5000 conejo 5664 + a las 48 horas
	0.2	»	5608	0	
	0.1	»	5629	0	
	0.05	»	5642	0	
851	0.5	»	5630	0	1/100000 conejo 5705 + a las 48 horas
	0.2	»	5733	0	
	0.1	»	5606	0	
	0.05	»	5594	0	

La cantidad mínima de proteína que ha revelado actividad ha sido de 2.5 mgs. para el suero 850 y de 3 mgs. para el 851. Estas tres experiencias prueban que la actividad de las globuli-

nas insolubles es muy grande, tanto en la protección como en la neutralización.

Ascoli <sup>(3)</sup> ha hallado que los anticuerpos del suero anticarbunclo se encuentran en las pseudoglobulinas. Nuestros experimentos hechos por fraccionamiento con sulfato de amonio no nos permitieron revelar anticuerpo alguno en las eu ni en las pseudo-globulinas. Cabe la suposición de que el anticuerpo ha quedado en las albúminas o ha sido destruído.

c). La labilidad de los anticuerpos protectores contenidos en las euglobulinas fué demostrada por calentamiento a 60° y por digestión con HCl N/20 a 37°.

Se precipitan euglobulinas por acción del H<sub>2</sub>O y del CO<sub>2</sub> y se disuelve el precipitado en solución fisiológica. Una parte se calienta a 60° por 20. A otra parte se agrega HCl de tal manera que el líquido quede a una concentración N/20, se mantiene a 37° por una hora y se neutraliza por NaOH.

Se inyectan cobayas por vía peritoneal con 5 cm.<sup>3</sup> de suero original y globulinas insolubles correspondientes a ese volumen de suero y a las 24 horas se inyectan con carbunco "Will", (20 dosis mortales mínimas.

Euglobulinas	Suero 850	Suero 851	Resultados
Calentadas a 60°	5 cm. <sup>3</sup>		+
	5 cm. <sup>3</sup>		+
		5 cm. <sup>3</sup>	+
		5 cm. <sup>3</sup>	+
Digeridas con HCl N/20 por una hora a 37° y neutraliza- das por NaOH	5 cm. <sup>3</sup>		+
	5 cm. <sup>3</sup>		+
		5 cm. <sup>3</sup>	+
		5 cm. <sup>3</sup>	+
Sin tratar	5 cm. <sup>3</sup>		0
	5 cm. <sup>3</sup>		0
		5 cm. <sup>3</sup>	0
		5 cm. <sup>3</sup>	0

## RESUMEN

El suero anticarbuncloso precipitante obtenido de acuerdo con la técnica ya descrita en la comunicación anterior, tiene propiedades anti-infecciosas fácilmente revelables. Protege a cobayas si se las inocula por vía subcutánea o peritoneal y a conejos por vía peritoneal o venosa.

La protección de las cobayas inyectadas por vía peritoneal se establece después de un tiempo. Por otras vías y para otras especies no se ha investigado esta propiedad. No se trata de un fenómeno de *desensibilización* o de protección de las células semejantes al de la sensibilización pasiva, pues aparte de que se puede explicar el fenómeno por otras causas, existe la demostración directa de la neutralización de un cultivo por el suero *in vitro*. Esta neutralización ha sido observada tanto para conejos como para cobayas.

La técnica usada para los experimentos de medición referidos en este trabajo semejante a la de Broq Rousseau, Staub y Urbain, consiste en usar un cultivo de 24 horas capsulado muy virulento crecido en agar suero, suspendido en caldo hasta tener 5.000 millones de gérmenes por cm.<sup>3</sup> (determinación por opacidad) y de allí diluído en caldo común de pH 8-8.4 hasta que 1 cm.<sup>3</sup> contenga por lo menos 20 dosis mínimas mortales, que es la dosis que se inyecta. La regularidad de la muerte de todos los animales da a esta técnica un valor singular, tal como lo reconocen Broq Rousseau, Staub y Urbain.

La protección de las cobayas se observa no sólo para la cepa virulenta Will, sino también para la vacuna Pasteur II y para una cepa de carbunco de campo, que no ha tenido pasaje alguno por animal de laboratorio. El suero protege también contra la infección con bazo de un animal que ha sucumbido a una infección de carbunco.

El suero anticarbuncloso inyectado por vía peritoneal a la cobaya carece de acción curativa cuando se inyecta 2 horas después del virus o simultáneamente con éste.

El poder del suero durante la inmunización aparece tardíamente y se requiere la inyección de una cantidad muy grande de gérmenes. En nuestros experimentos han sido necesarias treinta semanas, en las que se inyectaron los animales semanalmente. La cantidad total de gérmenes virulentos inoculados ha

sido de 1.000 cm.<sup>3</sup> de 100.000 millones por cm.<sup>3</sup>. Algunos animales dan suero activo a los cinco meses de inmunización con una cantidad de antígeno inyectado igual a 400 cm.<sup>3</sup> de 100.000 millones.

La precipitación de este suero carbuncoso por dilución a 1/10 con agua destilada saturada de CO<sub>2</sub> permite separar dos porciones, una soluble (albúminas y pseudoglobulinas?) otra insoluble (euglobulinas?). Los anticuerpos protectores están contenidos en la parte insoluble. La parte soluble (albúmina y pseudoglobulina) carece de toda actividad.

La concentración que se puede realizar por este procedimiento es muy grande, pues la cantidad de proteínas que precipitan es solo 1/5 del total de las proteínas del suero.

Ha sido posible proteger cobayas por inyección intraperitoneal de seis mgs. de globulinas insolubles como así mismo neutralizar la acción de un cultivo con menos de 12 mgs. La dosis de cultivo usada ha sido de 20 D. M. M.

Una experiencia con conejos nos ha permitido neutralizar 20 dosis mínimas mortales con dos y medio miligramos de globulina insolubles.

Los anticuerpos contenidos en las globulinas insolubles son destruidos por calentamiento de 60° y acidificación en solución N/20 de CHI.

Recordaremos que las precipitinas están contenidas en la misma fracción que los anticuerpos protectores.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. — BROCC ROUSSEU, STAUB ET URBAIN.—Nouvelle technique de preparation d'un sérum anticharbonneux. Peut on titrer ce sérum? *Annales de l'Institut Pasteur*, pág. 595, t. 40, 1926.
2. — MENDEZ.—Über Milzbrandantitoxin. *Centralblatt f. Bakt.* p. 405, t. 37, 1904.
3. — ASCOLI.—Zur Kenntnis der Aktiven Substanzen des Milzbrandserum, *Zeitschrift für physiologische Chemie*, p. 315, t. 48, 1906.
4. — TAKIMA MATSUMOTO.—Herstellung und Wirkung antiaggressiven. Milzbrandserum. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*. p. 402, t. 40, 1924.