

Las sensibilizatrices del suero anticarbuncloso

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

Casi todos los autores reconocen que el suero anticarbuncloso en presencia del antígeno específico tiene la propiedad de fijar el complemento. Así por ejemplo Eichhorn, Berg y Kelsner ⁽¹⁾ observan que la fijación es evidente con sueros inmunes y nula con sueros normales. El paralelismo entre la fijación y la capacidad de proteger contra la infección carbunclosa sugiere a los autores la posibilidad de usar el método de fijación para determinar la actividad del suero.

Dessy ⁽²⁾ encuentra que el suero de los caballos, vacas, cabras, ovejas y conejos normales no fija el complemento. Los sueros de caballos, vacas y ovejas inmunizadas poseen una actividad variable, siendo los primeros los que fijan con menor dosis. Este autor encuentra paralelismo entre el poder protector del suero y el título de fijación del complemento. A diferencia de Beltrami y Grassi ha hallado que los sueros fijan el complemento aún después de calentados a 55°. Algún paralelismo fué hallado por Dessy entre la fijación del complemento y aglutinación y precipitación.

Beltrami y Grassi ⁽³⁾ han estudiado este asunto, encontrando que el suero inmune de bovino o de caballo fijan muy debilmente. Por el contrario, el suero normal de mula fija con una intensidad igual a la del suero inmune. Los autores deducen de

(1) *Journal of Agricultural Research*. Vol. VIII, N° 2, pág. 37, año 1917.

(2) *Revista Sudamericana de Endocrinol. Inmunolog. y Quím.* Año II, 1919, pág. 113.

(3) *Revista del Instituto Bacteriológico*. Vol. II, año 1920, pág. 688.

estos datos que el método no puede servir para una medición de la actividad del suero anticarbuncloso.

En la presente comunicación nos ocuparemos de la propiedad del suero anticarbuncloso de fijar el complemento, analizando el fenómeno con algún detalle por haber hallado algunos hechos que a nuestro entender son curiosos y que pueden tener aplicación para la interpretación de fenómenos semejantes observados con otros sueros.

I

LA FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO DEL SUERO CARBUNCLOSO EN PRESENCIA DE UN ANTÍGENO ESPECÍFICO

La técnica utilizada en nuestras experiencias es la generalmente empleada para la fijación del complemento. La dosis de glóbulos es de 1 cm.³ de una suspensión al 5 %, de sangre de oveja, sensibilizados con 5 dosis hemolíticas de suero hemolítico de conejo contenidas en 1 cm.³ de solución fisiológica. El título hemolítico se determina con 0.05 cm.³ de suero fresco de cobaya (mezcla de tres por lo menos) haciendo la lectura después de media hora de permanencia a 37°. El volumen final de todas las mezclas es de 3 cm.³ La dosis de complemento empleada se determina cada vez poniendo en presencia de la cantidad de antígeno que se ha elegido (entre 0.1 y 0.45 cm.³ de una suspensión de 5000 millones de *B. anthracis* por cm.³), cantidades variables de complemento. El volumen de esta mezcla es de 1 cm.³ Después de permanecer a 37° por una hora se le añaden los glóbulos sensibilizados (un cm.³ de glóbulos al 5 % más 1 cm.³ de suero hemolítico que contiene 5 dosis hemolíticas). La dosis de complemento que se usa es la hemolítica límite, esto es la menor dosis que hemoliza totalmente. Es conveniente que al determinar la dosis de complemento en presencia de antígeno se lo titule también solo, simultáneamente, para apreciar el grado de inhibición ejercido por el antígeno. En caso de que la diferencia de título entre el complemento solo y en presencia de antígeno fuera muy grande, será prudente reducir la dosis de antígeno, pues es más probable que en estas condiciones no aparezcan las acciones no específicas, aparte de que los pequeños errores que

se cometen en la medición del antígeno en cada tubo influirán menos sobre la cantidad de complemento libre.

Como antígeno se empleó casi sin excepción una suspensión en solución fisiológica de *B. anthracis* (cepa Will), cultivado en agar-suero por 24 horas a 37°. La cantidad de gérmenes era aproximadamente de 5.000 millones por cm.³. La suspensión era preparada 2 o 3 horas antes de ser empleada.

PROTOCOLO I.

Dosis de antígeno 0.2 cm.³ (suspensión de 5.000 millones de la cepa Will).

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.15 cm.³

Dosis hemolítica de complemento 1/10 en presencia de antígeno=0.20 cm.³

Suero carbuncl.	Comple-mento 1/10	Antígeno			RESULTADOS			
					Suero 533 (*)	Suero 535 (*)	Suero 850 (**)	
0.05	0.20	0.20	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³	1 hora a 37°	2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	O	O	O
0.02	0.20	0.20				O	O	O
0.01	0.20	0.20				O	O	pH
0.005	0.20	0.20				O	O	H
0.05	0.20	—				H	H	H
—	0.20	0.20				H	H	H

* Sangrías del 30-IV-1928.

** Mezcla de varios sueros.

Los signos usados son: O para ausencia total de hemolisis.

pH » poca hemolisis.

¼, ½ y ¾ » ¼, ½ y ¾ de hemolisis.

CH » hemolisis casi total.

H » hemolisis total.

Los sueros ensayados revelan, poseer un poder de fijación intenso. Comportamiento análogo fué observado con todos los

sueros investigados. Hay que reconocer, sin embargo, que en algunas ocasiones entre las decenas de ensayos realizados la fijación era muy pobre. La explicación de este hecho se encontrará en las páginas siguientes cuando nos ocupemos del mecanismo del fenómeno.

II

ESPECIFICIDAD DEL FENÓMENO

La fijación del complemento por acción del suero carbuncloso sobre un antígeno de *B. anthracis* es un fenómeno relativamente específico como es frecuente observar en casos semejantes. Las pruebas realizadas fueron de dos tipos: 1º por acción de un suero carbuncloso sobre un antígeno de bacterias carbuncló similares y 2º por acción de sueros diferentes, sobre la emulsión de *B. anthracis*.

PROTOCOLO II

Fijación de complemento por acción de un suero carbuncloso sobre B. pseudoanthracis. ()*

Antígenos usados: emulsión de 5000 millones de gérmenes *pseudoanthracis* (bacilos esporulados móviles cuyo aspecto morfológico y el de sus colonias los aproximan al *B. anthracis*). Razas A, C, R, S.

Emulsión de 5000 millones de carbuncló Will.

Dosis de antígeno 0.2 cm.³ (suspensión de 5000 millones).

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.30 c. c.

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.40 para los cinco antígenos.

Suero específico N° 533. Sangría del 30-IV-1928.

* Esta designación no corresponde a una especie.

Suero carbunc. 533	Complemento 1/10	Antígeno			RESULTADOS				
					Antíg. A.	Antíg. C.	Antíg. R.	Antíg. Z.	Carb. Will. (**)
0.05	0.40	0.2	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³ 1 hora a 37° 2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	H	H	H	H	1/4 H	
0.02	0.40	0.2		H	H	H	H	O	
0.01	0.40	0.2		H	H	H	H	1/2 H	
0.005	0.40	0.2		H	H	H	H	3/4 H	
0.002	0.40	0.2		H	H	H	H	CH	
0.05	0.40	—		H	H	H	H	H	

La fijación no se observa con ninguno de los cuatro gérmenes usados. Es en cambio manifiesta hasta con 0.01 cm.³ de suero con el antígeno de carbunco Will.

PROTOCOLO III

Fijación del complemento por acción de un suero no específico sobre B. anthracis.

Sueros usados: antineumocócico, antitífico, anticolérico, preparados por inmunización intravenosa de caballos. Tienen, especialmente el suero neumocócico, la propiedad de ser muy lábiles sus globulinas por acción del agua destilada.

(a)

Dosis de antígeno 0.2 cm.³ (suspensión de 5000 millones de la cepa Will).

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.20 cm.³

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.20.

(**) Este comportamiento será aclarado en páginas subsiguientes.

Dosis de suero usada	Complemento 1/10	Antígeno				RESULTADOS		
						Suero tífico	Suero colérico	Suero carbuncloso 533
0.05	0.20	0.20	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³	1 hora a 37°	2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	O	O	O
0.02	0.20	0.20				CH	CH	O
0.01	0.20	0.20				H	H	O
0.005	0.20	0.20				H	H	O
0.05	0.20	—				H	H	H

(b)

Dosis de antígeno 0.15 cm.³ (suspensión de 5000 millones de la cepa Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.20 cm.³

Dosis hemolítica de complemento 1/10 en presencia de antígeno=0.25 cm.³

Dosis de suero	Complemento 1/10	Antígeno				RESULTADOS		
						Suero neumocócico	Suero normal	Suero carbuncloso 850
0.05	0.25	0.15	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³	1 hora a 37°	2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	¼ H	CH	O
0.02	0.25	0.15				H	H	O
0.01	0.25	0.15				H	H	O
0.005	0.25	0.15				H	H	O
0.002	0.25	0.15				H	H	O
0.05	0.25	—				H	H	H

La fijación con sueros tífico y colérico aunque mucho menor que la obtenida con suero específico, es evidente y debe atribuirse a una acción general del *B. anthracis* que parece facilitar la destrucción del complemento en presencia de ciertos sueros. No obstante, la diferencia entre la actividad de los sueros carbunclosos y los demás es tan grande, que la acción específica es manifiesta.

III

Aparición de las propiedades fijadoras en la inmunización.

En comunicaciones anteriores nos ocupamos de la elevación del título aglutinante o del poder precipitante durante la inmunización, como así mismo del paralelismo entre estas propiedades y el poder de protección contra la infección experimental. Es fácil de ver en dichos trabajos que la elevación es muy lenta y que el máximo se alcanza a los 6 a 8 meses de comenzada la inmunización.

En el caso que nos ocupa, de la fijación del complemento sucede de manera distinta, pues existe un aumento rápido de la capacidad de fijación ya desde el comienzo de la inmunización. En algunos casos y cuando aparecen los otros anticuerpos, la fijación es menos intensa.

PROTOCOLO IV

Fijación del complemento con sueros de distintas sangrías.

Dosis de antígeno 0.2 cm.³ (suspensión de 5000 millones de la cepa Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.15 cm.³

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.20 cm.³

Dosis de suero	Complemento 1/10	Antígeno				R E S U L T A D O S					
						Suero 533			Suero 535		
						Sang. IX-27	Sang. I-28	Sang. IV-28	Sang. IX-27	Sang. I-28	Sang. IV-28
0.05	0.20	0.20	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³	1 hora a 37°	2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	0	0	0	0	0	0
0.02	0.20	0.20				0	0	0	0	0	0
0.01	0.20	0.20				0	0	0	0	0	0
0.005	0.20	0.20				pH	0	0	0	pH	0
0.05	0.20	—				H	H	H	H	H	H

Si se comparan los resultados de la fijación de la sangría del IX - 27 con la actividad precipitante, aglutinante o protec-

tora, puede verse bien que la primera propiedad que aparece en el suero carbuncloso es la de fijar el complemento.

IV

Propiedad de las distintas fracciones del suero anticarbuncloso.

Ya en las comunicaciones anteriores hemos demostrado que por medio de la dilución con agua destilada es posible separar una fracción activa insoluble y dejar en solución la parte inactiva. Con el fin de averiguar si algo análogo acontecía con la fijación del complemento se hicieron las experiencias protocolizadas a continuación.

PROTOCOLO V.

Se diluyen los sueros 850 y 851 con nueve veces su volumen de agua destilada saturada de anhídrido carbónico y el precipitado se separa por centrifugación. El precipitado está constituido por globulinas y en el líquido quedan las albúminas y las globulinas solubles (globulinas albúminas *).

Una parte de las globulinas insolubles se disuelve en solución fisiológica y otra parte en suero normal.

En el cuadro siguiente las dosis de suero se refieren al volumen del suero original.

Dosis de antígeno 0.1 cm.³ de una suspensión de 5000 millones de carbunclo Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10=0.4 cm.³.

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.5 cm.³.

Dosis de suero	Complemento 1/10	Antígeno				Suero total		Globulinas		Globulinas + S. normal		Globulinas + globulinas albúminas		Globulinas albúminas	
						850	851	850	851	850	851	850	851	850	851
0.05	0.5	0.1	Solución fisiológica hasta 1 cm. ³ 1 hora a 37° 2 cm. ³ glóbulos sensibilizados	O	O	H	H	1/2 H	1/2 H	O	O	O	O	O	O
0.02	0.5	0.1		O	O	H	H	H	H	O	O	O	O	O	O
0.05	0.5	—		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

(*) A estas globulinas albúminas solubles se les añade Cl Na hasta concentración de 9 o/oo.

Las globulinas insolubles no tienen ninguna actividad. Mezcladas con suero normal su poder de fijación es muy pequeño en comparación con el suero total. Las albúminas y globulinas solubles tienen la propiedad de sensibilizar el antígeno y lo conservan si se le añade la fracción de globulinas insolubles.

Las globulinas insolubles en agua destilada que contienen los anticuerpos precipitantes aglutinantes y protectores, carecen de actividad sensibilizante; por el contrario, las albúminas y globulinas solubles que no precipitan, no aglutinan ni protegen, tienen toda la actividad sensibilizante.

Ya desde los comienzos de la inmunización es dable observar esta propiedad de las albúminas y globulinas solubles (ver protocolo siguiente).

PROTOCOLO VI.

Se fraccionan con agua destilada sueros obtenidos en distintas épocas de la inmunización.

Dosis de antígeno de 0.2 cm.³ de 5000 millones por cm.³ (Will).

Dosis de complemento 1/10=0.20 cm.³

Dosis de suero	Complemento 1/10	Antígeno	SUERO 533				SUERO 535			
			Sangría IX-27		Sangría IV-28		Sangría IX-27		Sangría IV-28	
			Total	Albúminas y globulinas						
0.05	0.20	2	O	O	O	O	O	O	O	O
0.02	0.20	2	O	O	O	O	O	O	O	O
0.01	0.2	0.2	O	O	O	O	O	pH	O	O
0.005	0.20	2	pH	pH	O	O	O	H	O	O
0.05	0.2		H	H	H	H	H	H	H	H

V

En la página 380 puede verse que la fijación del complemento es más intensa con una dosis intermedia de suero que con

las dosis mayores o menores. Este hecho fué observado muchas veces, cuando usábamos sueros de animales muy inmunizados. Es como se sabe un fenómeno conocido y suele designarse con el nombre de fenómeno de Wechsberg Neisser y cuya interpretación es fácil si se recuerda la naturaleza coloidal de los cuerpos que intervienen en la reacción.

A continuación se transcriben tres protocolos que ilustran esta característica.

PROTOCOLO VII.

Dosis de antígeno 0.15; suspensión de 5000 millones de cepa Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.40 cm.³

(a)

Suero 850	Complemento 1/10	Antígeno	Resultados
0.05	0.40	0.15	½ H
0.02	0.40	0.15	½ H
0.01	0.40	0.15	¼ H
0.005	0.40	0.15	¼ H
0.002	0.40	0.15	H
0.001	0.40	0.15	H
0.0005	0.40	0.15	H
0.0002	0.40	0.15	H
0.05	0.40	—	H

(b)

Dosis de antígeno 0.45 (suspensión de 5000 millones de cepa Will).

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.60 cm.³

Suero 850	Complemento 1/10	Antígeno	Resultados
0.05	0.60	0.45	$\frac{1}{4}$ H
0.02	0.60	0.45	pH
0.01	0.60	0.45	O
0.005	0.60	0.45	O
0.002	0.60	0.45	$\frac{1}{4}$ H
0.001	0.60	0.45	$\frac{1}{4}$ H
0.0005	0.60	0.45	$\frac{1}{2}$ H
0.0002	0.60	0.45	$\frac{3}{4}$ H
0.05	0.60		H

(c)

Dosis de antígeno 0.15 cm.³ (suspensión de 5000 millones cepa Will).

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.25 cm.³

Suero 850	Complemento 1/10	Antígeno	Resultados
0.05	0.25	0.15	O
0.02	0.25	0.15	O
0.01	0.25	0.15	O
0.005	0.25	0.15	O
0.002	0.25	0.15	O
0.05	0.25		H

La observación de los dos primeros protocolos revela que la fijación tiene un máximo con una dosis intermedia. En cambio en el tercero la fijación es total en todos los tubos y no aparece el fenómeno de Wechsberg Neisser. No es difícil sin embargo que con dosis superiores o inferiores a las usadas, este hubiera aparecido. Llama la atención si se comparan los tres protocolos entre sí, la diferencia grande de actividad que revela

el mismo suero. Parece que variara mucho la capacidad anti-génica de la suspensión de *B. anthracis*.

Cuando se sustituye el suero total por la fracción globulinas albúminas solubles en agua destilada, el fenómeno de Wechsberg Neisser no aparece. Además la fijación se hace sin excepción mucho más intensa como puede verse en el protocolo siguiente.

PROTOCOLO VIII.

Se fracciona el suero por agua destilada y se investiga la capacidad de fijación del suero total y de la fracción globulinas albúminas con el antígeno total usado en todos los otros experimentos y además con el líquido separado de los cuerpos bacterianos, que contienen, como ya se ha probado en un trabajo anterior, sustancias específicas del *B. anthracis*.

Dosis de antígeno total 0.1 cm.³ (suspensión de 5000 millones de cepa Will), y 0.1 cm.³ del líquido sobrenadante sin bacilos.

Dosis hemolítica de complemento 1/10 en presencia de antígeno=0.20 cm.³ para ambos.

Dosis de Suero	Antígeno	S U E R O 8 5 0				S U E R O 8 5 1			
		Suero 850		Globulinas albúminas 850		Suero 851		Globulinas albúmina 851	
		Antígeno		Antígeno		Antígeno		Antígeno	
		Total	Sobrenadante	Total	Sobrenadante	Total	Sobrenadante	Total	Sobrenadante
0.05	0.1	H	H	O	O	H	H	O	O
0.02	0.1	³ / ₄ H	¹ / ₂ H	O	O	CH	H	O	O
0.01	0.1	¹ / ₂ H	H	O	O	³ / ₄ H	H	O	O
0.05	—	H	H	H	H	H	H	H	H

Las globulinas insolubles no tienen acción alguna.

Si a la fracción globulinas albúmina se le agrega la fracción de globulinas insolubles, la fijación del complemento se

hace prácticamente igual a la del suero total. Es decir, que los anticuerpos precipitantes o aglutinantes impiden o dificultan la fijación del complemento, y es fácil observar que cuando los antígenos están aglutinados por el suero carbuncloso fijan menos el complemento.

Los protocolos siguientes revelan de una manera clara la influencia de los anticuerpos aglutinantes, siendo dado observar o que a medida que aumenta la dosis de globulinas aglutinantes, la misma dosis de anticuerpos sensibilizantes (globulinas albúminas solubles) tienen menos actividad, o que fijada la dosis de anticuerpos aglutinantes la actividad de la fracción globulinas albúminas solubles (anticuerpos sensibilizantes) es proporcional a la cantidad usada (falta el fenómeno de Wechsberg Neisser) o que la variación simultánea y en el mismo grado de ambos anticuerpos hace aparecer la zona de máxima fijación (fenómeno de Wechsberg Neisser). Los testigos revelan que el suero total presenta el fenómeno zonal, las globulinas albúminas solubles dan el máximo de fijación y las globulinas insolubles carecen de poder fijador.

La adición de las globulinas insolubles a las globulinas albúminas en la misma proporción que el suero, permite obtener una mezcla de propiedades casi idénticas al suero primitivo. Las euglobulinas del suero neumocócico carecen de actividad. Se trata, pues, de la acción específica ejercida por los anticuerpos aglutinantes o precipitantes contenidos en las globulinas insolubles.

PROTOCOLO IX.

Dosis de antígeno 0.2 cm.³ de una emulsión de 5000 millones de cepa Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno = 0.20.

Las dosis de globulinas insolubles o de globulinas albúminas se refieren a volúmenes del suero original en que están contenidas dichas substancias.

(a)

Dosis de globulinas (insolubles en H ₂ O)	Dosis de globulinas albúminas (solubles en H ₂ O)	Complemento 1/10	Antígeno	Resultados
0.005	0.05	0.2	0.2	O
0.005	0.02	0.2	0.2	O
0.005	0.01	0.2	0.2	pH
0.005	0.005	0.2	0.2	¼ H
0.005	0.002	0.2	0.2	½ H
0.005	0.05	0.2	—	H
0.01	0.05	0.2	0.2	O
0.01	0.02	0.2	0.2	pH
0.01	0.01	0.2	0.2	¼ H
0.01	0.005	0.2	0.2	½ H
0.01	0.002	0.2	0.2	H
0.01	0.05	0.2	—	H
0.02	0.05	0.2	0.2	¼ H
0.02	0.02	0.2	0.2	½ H
0.02	0.01	0.2	0.2	½ H
0.02	0.005	0.2	0.2	½ H
0.02	0.002	0.2	0.2	CH
0.02	0.05	0.2	—	H
0.05	0.05	0.2	0.2	½ H
0.05	0.02	0.2	0.2	¾ H
0.05	0.01	0.2	0.2	CH
0.05	0.005	0.2	0.2	CH
0.05	0.002	0.2	0.2	CH
0.05	0.05	0.2	—	H

(b)

Ordenando los mismos datos de manera distinta es más fácil ver la disminución de actividad de la misma dosis de globulina albúmina a medida que se aumenta la dosis de globulinas insoluble en agua.

Dosis de globulinas albúminas (solubles en agua)	Dosis de globulinas (insolubles en agua)	Resultados
0.05	0.005	O
0.05	0.010	O
0.05	0.02	¼ H
0.05	0.05	½ H
0.02	0.005	O
0.02	0.01	pH
0.02	0.02	½ H
0.02	0.05	¾ H
0.01	0.005	¼ H
0.01	0.01	¼ H
0.01	0.02	½ H
0.01	0.05	CH

(c)

Del mismo cuadro (a) se puede deducir que el fenómeno zonal existe si se toman las mismas dosis de globulinas y globulinas albúminas que corresponden al suero original.

Dosis de globulinas albúminas (solubles en agua)	Dosis de globulinas (insolubles en agua)	Resultados
0.05	0.05	½ H
0.02	0.02	½ H
0.01	0.01	¼ H
0.005	0.005	¼ H

TESTIGOS

(d)

Dosis de suero	Suero 850	Globulinas albúminas (solubles)	Globulinas insolubles	Globulinas albúminas (solubles) + globulinas (insolubles)	Globulinas albúminas (solubles) + globulinas (insolubles) Suero neumocócico.
0.05	½ H	O	H	C H	O
0.02	¼ H	O	H	½ H	O
0.01	pH	O	H	pH	O
0.005	pH	O	H	pH	O
0.002	¼ H	pH	H	pH	pH
0.05	H	H	H	H	H (testigo)

La interpretación de estos fenómenos es en cierto modo simple, pues basta admitir que el antígeno se modifica por los anticuerpos aglutinantes y precipitantes y pierde su actividad para fijar las sensibilizatrices y por consecuencia el complemento. Esta hipótesis está apoyada por el hecho observado siempre, que en los casos en que hay aglutinación la fijación del complemento ha presentado el fenómeno zonal.

Algunos experimentos realizados con el fin de averiguar si esta hipótesis puede ser apoyada en nuevos hechos, nos permitieron hallar una nueva modalidad del fenómeno de fijación que juzgamos interesante. Es un hecho conocido (Sachs), que cuando un antígeno tiene la propiedad de ser aglutinado o precipitado, la fijación del complemento por acción de las sensibilizatrices es menos intensa cuando el complemento se encuentra en presencia del antígeno aglutinado. Son los "copos" del precipitado en estado naciente los que tienen la propiedad de absorberlo, con más intensidad.

Algo semejante fué encontrado para el caso del suero carbuncoso y el *B. anthracis*, como puede verse por los resultados consignados en el protocolo siguiente.

PROTOCOLO X.

Dosis de antígeno 0.15 cm.³ (suspensión de 5000 millones de bacilos de cepa Will.

Dosis hemolítica de complemento 1/10, en presencia de antígeno=0.15 cm.³

Serie (a)

Se distribuye primeramente el suero, luego se agrega la solución fisiológica y por último se agrega una mezcla de antígeno y complemento en la proporción de 0.15 y 0.25 cm.³ de cada uno.

Dosis de suero	Suero 850	Globulinas insolubles	Globulinas albúminas (solubles)
0.05	O	H	O
0.02	O	H	O
0.01	O	H	O
0.005	O	H	O
0.002	O	H	O
0.05 Control	H	H	H

Serie (b)

Se distribuye primeramente el suero, y luego se agrega el antígeno y la solución fisiológica. La mezcla permanece a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agrega 1 dosis hemolítica de complemento.

Dosis de suero	Suero 850 (1)	Globulinas (insolubles).	Globulinas albúminas (solubles) (2)
0.05	H	H	O
0.02	$\frac{3}{4}$ H	H	O
0.01	$\frac{1}{2}$ H	H	O
0.005	$\frac{1}{4}$ H	H	O
0.002	$\frac{3}{4}$ H	H	O
0.05	H	H	H

(1) Hay aglutinación.

(2) No hay aglutinación.

Serie (c)

Se distribuyen primero las globulinas (insolubles) del suero 850 y luego se agrega el antígeno y la solución fisiológica. Al cabo de una hora se añaden las globulinas albúminas (solubles) del suero 850 y el complemento.

Globulinas (insolubles)	Antígeno	Globulinas albúminas (solubles)	Resultados
0.05	0.15	0.05	CH
0.02	0.15	0.02	½ H
0.01	0.15	0.01	O
0.005	0.15	0.005	¼ H
0.002	0.15	0.002	½ H
0.05	—	—	H

Los resultados de este experimento son muy semejantes a los de la primera columna (suero 850) de la serie (b).

Influye pues de una manera primordial la alteración del antígeno por acción de los anticuerpos contenidos en las globulinas insolubles.

De los protocolos anteriores fluye como consecuencia de importancia práctica para los casos semejantes al que nos ocupa, en que se investiguen sensibilizatrices, la de que el orden de adición de los elementos en la reacción de fijación sea tal que el antígeno se encuentre en presencia de la sensibilizatriz cuando ya haya complemento.

En la investigación de hechos relacionados con este problema hemos podido observar que aún en los casos que las sensibilizatrices se encuentren *practicamente* libres de anticuerpos coagulantes existe una diferencia entre la fijación del complemento según el orden de adición de los elementos.

En el protocolo (XI) se han hecho dos series de ensayos, con dosis diferentes de antígeno. En cada uno de éstos se ha investigado la fijación del complemento, ya añadiendo el complemento después que el antígeno y los anticuerpos hubieron permanecido en contacto por una hora, ya añadiendo simultáneamente el antígeno y el complemento.

PROTOCOLO XI

En los resultados figuran dos columnas. La primera (A. C.) corresponde a las experiencias en que se ha añadido el complemento después que el antígeno ha permanecido en contacto con el anticuerpo durante 1 hora a T ambiente; la segunda (C. A.) a las que se han agregado conjuntamente complemento y antígeno.

a). Dosis de antígeno 0.15 cm.³ de una emulsión de 5000 millones de bacilos (cepa Will).

Dosis de suero	Suero 850		Globulinas albúminas (solubles)	
	A. C.	C. A.	A. C.	C. A.
0.05	C. H.	½ H	O	O
0.02	½ H	½ H	O	O
0.01	¾ H	¼ H	¼ H	O
0.005	C. H.	¾ H	¼ H	½ H
0.002	H	H	C. H.	¾ H
0.001	H	H	H	C. H.
0.0005	H	H	H	C. H.
0.0002	H	H	H	C. H.
0.05 Control	H	H	H	H

b). Dosis de antígeno 0.45 cm.³ de una emulsión de 5000 millones de bacilos (cepa Will).

Dosis de suero	Suero 850		Globulinas albúminas (solubles)	
	A. C.	C. A.	A. C.	C. A.
0.05	C. H.	¼ H	O	O
0.02	¾ H	pH	O	O
0.01	¾ H	O	H	O
0.005	½ H	O	H	O
0.002	½ H	¼ H	H	pH
0.001	¾ H	¼ H	H	¼ H
0.0005	C. H.	½ H	H	½ H
0.0002	H	¾ H	H	¾ H
0.05 Control	H	H	H	H

VI

Los anticuerpos de fijación tienen las características de una sensibilizatríz?

Los anticuerpos de fijación tienen casi sin excepción la propiedad de sensibilizar al antígeno y suelen ser bautizados ya como sensibilizatrizes o amboceptores. Era lógico esperar que los anticuerpos fijadores del suero anticarbuncloso tuvieran esa propiedad.

Se investigó si los anticuerpos de fijación del suero eran absorbidos por una emulsión de *B. anthracis* y si el antígeno así tratado tenía la propiedad de fijar el complemento.

Se emplea una emulsión de 5000 millones de bacilos (cepa Will), el suero 850 y la fracción globulinas albúminas (solubles).

Suero	Dosis	Antígeno	Solución Fisiológica	A 37°		
850	1 cm. ³ 1/10	4 cm. ³	0 cm. ³	2 horas	Centrifugación.	(1)
»	1 cm. ³ 1/10	0 cm. ³	4 cm. ³	2 horas		(2)
Globulinas albúminas	1 cm. ³ 1/10	4 cm. ³	0 cm. ³	2 horas		(3)
Globulinas albúminas	1 cm. ³ 1/10	0 cm. ³	4 cm. ³	2 horas		(4)
Suero Normal	1 cm. ³ 1/10	4 cm. ³	0 cm. ³	2 horas		(5)
Suero Normal	1 cm. ³ 1/10	4 cm. ³	0 cm. ³	0 horas		(6)
Suero Normal	1 cm. ³ 1/10	0 cm. ³	4 cm. ³	2 horas		(7)
—	--	4 cm. ³	1 cm. ³	0 horas		(8)

Las mezclas indicadas más arriba se dejan incubar a 37° y luego se centrifugan.

Como dosis de complemento se usa la dosis mínima en presencia de 0.2 cm.³ de antígeno.

El título del complemento es verificado nuevamente con los líquidos 6 y 8. La reacción principal se hace con los líquidos sobrenadantes 1, 2, 3, 4, 5 y 7, añadiendo 0.2 de antígeno y la dosis hemolítica del complemento.

Dosis de líquidos sobrenadante.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(7)
0.5	O	¾ H	O	pH	H	H
0.2	½ H	CH	¼ H	¾ H	H	H
0.1	CH	CH	CH	H	H	H
0.05	H	CH	H	H	H	H
0.5	H	H	H	H	H	H

Comparando los resultados de las columnas 1 y 2, llama la atención que el poder de fijación del suero sea mayor después de haber sido absorbido por *B. anthracis*. Igual hecho sucede con los resultados de las columnas 3 y 4.

Parece que el *B. anthracis* absorbiera solo los anticuerpos coagulantes que son los que dificultan la fijación del complemento y que las sensibilizatrices quedaran en libertad.

Otros experimentos permitieron establecer que si se ponen en contacto *B. anthracis* con suero específico el sedimento de *B. anthracis* no tiene la propiedad de fijar el complemento, y en el líquido sobrenadante quedan los anticuerpos fijadores.

RESUMEN

El suero anticarbuncloso obtenido por inmunización de caballos por vía venosa con *B. anthracis* capsulados y virulentos, tiene la propiedad de fijar el complemento en presencia de un antígeno específico. El fenómeno tiene caracteres de especificidad como lo comprueban la inactividad del suero carbuncloso con antígenos distintos de *B. anthracis* o del *B. anthracis* en presencia de sueros inmunes distintos del anticarbuncloso.

La propiedad sensibilizante aparece mucho más precozmente que las de precipitar, aglutinar o proteger animales contra la infección carbunclosa.

La dilución con agua destilada permite fraccionar al suero en dos partes, una de globulinas insolubles y otra constituida por las globulinas, y las albúminas solubles.

La fracción globulinas albúminas tiene la propiedad de fijar el complemento mientras las globulinas insolubles carecen por completo de actividad. Recordaremos que éstas contie-

nen todas las precipitinas, aglutininas y anticuerpos protectores. Esta propiedad y la rapidez con que la capacidad de fijación aparece durante la inmunización, revelan que las sensibilizatrices no pueden ser un índice de la actividad del suero carbuncloso.

Es frecuente observar que las dosis intermedias del suero carbuncloso fijan con mayor intensidad el complemento, que las mayores o menores. Este fenómeno se presenta solamente cuando hay anticuerpos aglutinantes y precipitantes. Con las globulinas albúminas solubles el fenómeno no aparece.

Las aglutininas y precipitinas no solo hacen aparecer el fenómeno de fijación zonal, sino que reducen considerablemente la capacidad fijadora de las globulinas albúminas solubles. Si la cantidad de globulinas insolubles es muy grande las propiedades fijadoras pueden desaparecer.

Este fenómeno puede ser explicado por la alteración del antígeno debido a la acción de las precipitinas y las aglutininas. Además puede observarse que si se deja el antígeno en presencia de los anticuerpos por un tiempo largo, la fijación del complemento es mucho más débil que si la mezcla de antígeno y anticuerpo se hace simultáneamente con el complemento.

En los experimentos de absorción parece que los anticuerpos coagulantes solamente fueran fijados mientras que las sensibilizatrices quedan en libertad. Se puede establecer además que los *B. anthracis* digeridos con suero específico, no quedan sensibilizados.

CONCLUSIONES

1. El suero preparado por inmunización de caballos por vía venosa con *B. anthracis* virulentos y capsulados es capaz de fijar específicamente el complemento.
2. La aparición de esta propiedad es muy prematura y precede a la de los demás anticuerpos.
3. Las globulinas albúminas solubles en agua destilada contienen las sustancias que fijan el complemento. Las globulinas insolubles carecen de la propiedad fijadora. Es sabido que estas globulinas contienen las precipitinas y las aglutininas y los anticuerpos protectores.

4. Es frecuente observar con el suero total el fenómeno de fijación zonal (Wechsberg y Neisser). Las globulinas albúminas solubles fijan en proporción de la cantidad presente. Las globulinas insolubles (conteniendo los anticuerpos coagulantes) hacen desaparecer el fenómeno zonal y reducen la capacidad fijadora de las globulinas albúminas solubles.

5. Las sustancias fijadoras no tienen las propiedades de las sensibilizatrices, pues no se fijan sobre el antígeno ni el antígeno se sensibiliza por acción del suero específico ni de su fracción de globulinas albúminas solubles.

6. La fijación del complemento es mayor si se ponen simultáneamente en presencia antígeno, suero y complemento que si se deja sensibilizar el antígeno previamente.

7. El fenómeno de fijación debe ser interpretado como obedeciendo a un mecanismo específico pero distinto del aceptado corrientemente para los anticuerpos designados como amboceptores o sensibilizatrices.