

Tesis de Posgrado

Activación e inactivación de la hemolisina perfringens

Crivelli, Mario Augusto

1944

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Crivelli, Mario Augusto. (1944). Activación e inactivación de la hemolisina perfringens. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0373_Crivelli.pdf

Cita tipo Chicago:

Crivelli, Mario Augusto. "Activación e inactivación de la hemolisina perfringens". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1944.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0373_Crivelli.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales.-

-000-

FOFBA

"ACTIVACION E INACTIVACION DE LA Θ HEMOLISINA

PERFRINGENS"

Tesis: 373

-000-

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Química por:

MARIO AUGUSTO CRIVELLI.

-000-

Año 1944.-

OPERA

Padre de Jesus

DOCTOR VENANCIO DEULOFEU

PROLOGO

Señores Profesores:

El presente trabajo que tengo el honor de someter a vuestro dictamen, fruto de las doctas lecciones y provechosos consejos que de vosotros he recibido, sólo tiene por objeto contribuir, aunque en grado muy pequeño, a aclarar algún aspecto del mecanismo de inactivación de la θ toxina perfringens.

Este estudio, denominado "tesis", tiene por fin, según mi modo de ver, demostrar cual es el grado de aprovechamiento y criterio del nuevo egresado.- Por eso creo que estos trabajos deben ser juzgados en forma especial, en efecto, ésta como casi todas las "tesis", presenta algunas deficiencias, que pueden ser atribuidas casi fundamentalmente a la siguiente causa: egresamos de la Facultad habiendo aprobado todas las asignaturas y habiendo cumplido con todos los programas, por lo tanto, nuestra educación química es bastante completa.- Pero cuando queremos efectuar una investigación determinada o profundizar sobre un tema particular, nos damos cuenta perfectamente que si bien nuestra cultura química general es suficiente para interpretar hechos corrientes, nos falta preparación para abordar profundamente una determinada investigación.-

Antes de entrar en materia, deseo dejar sentado mi más profundo agradecimiento a todos los profesores de la carrera, que ya sea desde su cátedra o por sus charlas amistosas han contribuido a darle forma definitiva a mi espíritu universitario.-

FOFNA

Desco asimismo, hacer llegar en especial al distinguido profesor, Doctor Venancio Deulofeu mi homenaje de gratitud, - por el alto honor que me dispensa, acompañándome en este acto.-

También al Doctor Alfredo Sordelli por los sabios consejos que de él he recibido y por las facilidades que me ha dado, poniendo a mi disposición lo necesario para llevar a cabo - este trabajo, dedico las expresiones de mi más profundo reconocimiento.-

No quiero terminar este prólogo, sin dejar sentado mi agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente, han contribuido a hacer posible la realización de este modesto trabajo.-

---oOo---

INTRODUCCION.

C O P H - B A

El *Clostridium perfringens*, llamado también *Bacillus aerogenes capsulado*, o *Clostridium welchii*, fué aislado por primera vez de un cadáver, por los investigadores Welch y Nuttal, (1892).-

Desde ese momento, su acción patógena sobre el organismo humano fué atribuída a mecanismos en que actúan las sustancias más diversas.- En efecto, años más tarde, Herter (1906-7), demostró que los cultivos de *Clostridium welchii*, contenían una hemolisina termostable, que producía la lisis de los glóbulos rojos de conejos y monos "rhesus".-

Sin embargo, investigaciones posteriores atribuyeron las lesiones de la gangrena gaseosa, a la formación de ácidos, principalmente el butírico, producido en el cultivo de este microorganismo.- Se creyó también en esta época, que el gas producido en los tejidos, tenía importancia en el desarrollo y generalización de la infección.-

A partir del año 1917, las investigaciones tomaron -- curso definitivo, pues Bull y Fritchett (1917 a,b,c,) demostraron que por desarrollo anaerobio del *Clostridium welchii*, aislado en casos de gangrena gaseosa humana, en infusiones de carne de vaca, conteniendo trozos frescos estériles de músculo de paloma o conejo, se puede obtener un filtrado de gran poder letal; es decir, una exotoxina que inyectada produce una antitoxina específica.-

Durante ese mismo año, De Kruij, Adams e Ireland , -- (1917), demostraron que todas las cepas examinadas producían una

FOENBA.

toxina, pero la actividad hemolítica de los filtrados era muy -
variada.- Asimismo De Kruif y Bollman (1917) admitieron que la
capacidad del *Clostridium welchii*, de invadir el cuerpo animal,
depende mucho de su poder productor de toxina.-

También en el año 1917, Ouranoff (1917), publicó un -
trabajo en el que informó que había encontrado muchas cepas de
Clostridium welchii, productoras, en condiciones adecuadas, de
una hemolisina muy activa contra glóbulos rojos de hombre, cer-
do, perro, vaca, oveja, etc..- La hemolisina es termolábil, --
pues colocada treinta minutos a 60°, se destruye.- Esta identi-
ficación de la toxina con la hemolisina, aunque más tarde sos-
tenida por autores como Ford y Williams, Wuth, y otros, es pueg
ta en duda por las investigaciones de Weinberg y Hasta (1920,
a,b,), que demuestran que la proporción de hemolisina en toxi-
nas de clases distintas, varía considerablemente.- Sugieren a-
demás, que las hemolisinas pueden jugar un papel importante en
las intoxicaciones bacterianas.-

Más tarde, Kojima (1922) encontró cultivando en cal-
dos glucosados especiales, una toxina hemolítica, termolábil, -
apenas letal, no dializable y con propiedades antigénicas inde-
pendientes de la toxina verdaderamente letal.-

Luego aparecen los trabajos de Henry (1922)(1923) y
de Wuth (1923).- El primero sugiere la presencia de dos toxi-
nas en los filtrados, ya que las toxinas precipitadas diferían
grandemente de los filtrados originales.- Wuth, en cambio, ais-

ló una toxina termolábil con propiedades hemolíticas y la estudió.-

Neill (1926), encuentra que como la straptolisina, tétanolisina y pneumolisina, la hemolisina del *Clostridium welchii*, es lábil al oxígeno, y se reactiva por reducción posterior con un agente como el hidrosulfito de sodio.-

Al año siguiente, Reed, Orr y Campbell (1927), confirman las experiencias de Neill, y demuestran que como se esperaba, la dosis hemolítica mínima (d.h.m.) de la toxina frente a glóbulos rojos oxigenados, es más alta que la dosis hemolítica-mínima frente a glóbulos rojos reducidos.-

A partir del año 1928, el problema adquiere una complejidad mucho mayor, debido a que hasta ese momento, sólo se habían estudiado cepas de origen humano, pero ahora aparecen microorganismos de origen animal, que deben incluirse en este grupo.-

En efecto, durante ese año, Dalling (1928), aísla - del bacilo disentérico del cordero, una bacteria semejante al *Clostridium welchii*, productora de una toxina sumamente potente que no es neutralizada por la antitoxina del clásico *perfringens*. Pero su antitoxina puede neutralizar la toxina del tipo humano, tan bien como la propia.-

Entre los años 1929-1930, Mc. Ewen (1930 a,b) aísla otro organismo morfológica y culturalmente semejante al *Clostridium perfringens* y lo llama *Bacillus paludis*.- El aislamiento lo hizo a partir de ovejas enfermas de un tipo de toxemia llamada "struck".-

Estudios de anaerobios causantes de infecciones en ovinos, dieron como resultado el descubrimiento de otro germen, que se clasificó dentro del grupo del perfringens.- Fué Bennetts (1932 a,b.), el que aisló de casos de enterotoxemia en ovas, - un organismo al que denominó Bacillus ovitoxicus.-

Como se podrá apreciar, esta multiplicidad de tipos bacterianos, creó dificultades en el estudio de los filtrados respectivos.- Como hemos visto, ya Henry en el año 1923, había sugerido la existencia de dos toxinas, una de las cuales es hemolítica y la otra letal.-

En el año siguiente, Schuayerson y Samuels (1930) demostraron que en los filtrados estériles de Clostridium welchii, se pueden encontrar dos hemotoxinas.- Una de ellas designada A, es activa in vitro, y probablemente algo activa in vivo.- La otra llamada B. no causa hemólisis in vitro, pero destruye enérgicamente los glóbulos in vivo.- Encontraron además que la hemotoxina A. es menos tóxica que la B, y que ambas no pueden ser separadas completamente.-

En el mismo año, Weinberg y Combiesco (1930 a,b.) demostraron la existencia de una toxina no específica, que ya había sido descrita por Wasserman, y luego por Kojima, y respecto a la cual ya Kendall y Schmitt (1926), habían demostrado que era una sustancia del tipo de la histamina.-

Más tarde, Walbum y Reymann (1933), demostraron que esa toxina no específica anteriormente citada, se produce cuando el Clostridium welchii, crece en medios que contienen glucosa; que no se neutraliza por la antitoxina; y que es capaz de -

matar instantaneamente a las lauchas, cuando es inoculada por vía venosa.-

La bibliografía como se puede notar, no trae ninguna cita sobre intento de clasificación, salvo el que efectuó Simonds (1915), basándose en la capacidad de fermentar glicerol e inulina, hasta que Wilsdon (1931-2-3), propuso la división de la especie pura, en cuatro tipos, denominados: A,B,C,D,; según su capacidad toxigénica.- Teniendo en cuenta las relaciones toxina-antitoxina, encontró tres factores que llamó: W,Z,X.- De modo que teniendo en cuenta, la clasificación de Wilsdon, podemos dividir la especie pura como sigue:

TIPO	ORIGEN	COMPOSICION ANTIGENICA
A	De origen humano o clásico Clostridium perfringens	W
B	Disentería del cordero: Bacillus agni	W + Z + X
C	Toxemia llamada "struck": Bacillus paludis.	W + Z
D	Enterotoxemia de la oveja: Bacillus ovitoxious	W + X

Como se ve Wilsdon, no consideró estos factores como entidades separadas, sino en forma similar a antígenos bacterianos.- Así por ejemplo, la toxina B (la más compleja), era considerada una especie molecular, con los grupos tóxico W,X,Z.-

Teniendo como base la clasificación de Wilsdon, pero usando métodos más seguros,Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Ross y

Dalling (1933), llegaron a demostrar que para explicar el comportamiento antigénico de los filtrados de *Clostridium welchii*, era necesaria la adición de dos nuevas toxinas, o en su defecto explicarlo teniendo en cuenta la complejidad del factor Z, de Wilsdon. Y propusieron la siguiente clasificación de acuerdo a los factores presentes en cada uno de los filtrados:

Filtrado tipo A: α

Filtrado tipo B: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$

Filtrado tipo C: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$

Filtrado tipo D: α, ϵ

La equivalencia entre los factores de Wilsdon y los factores de Glenny y al., puede resumirse de la siguiente manera:

$\alpha = W$ de Wilsdon

$\alpha + \gamma + \delta = Z$ de Wilsdon

$\epsilon = X$ de Wilsdon

Pero más tarde, Prigge (1936), demostró que ciertos filtrados del tipo A., contienen dos toxinas que él llamó α y γ . Hoy en día se admite que: la γ toxina de Prigge es igual a la α toxina de Glenny y al., y como α toxina del *Clostridium welchii* ha sido puesta en uso.- La α toxina de Prigge es usualmente llamada θ toxina.-

Finalmente, Ipsen (1939) encontró en los filtrados del tipo A., tres toxinas que llamó: α, γ, η .

De manera que, debido a las experiencias de Prigge primeramente, y luego a las de Ipsen y al., la clasificación de --

Glenny anteriormente citada, puede modificarse de la siguiente forma:

Filtrado tipo A: α, θ, η .

Filtrado tipo B: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$

Filtrado tipo C: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$

Filtrado tipo D: α, ϵ

---oOo---

Caracteres generales de las toxinas citadas

Toxina α : (equivale al factor W de Wilsdon y a la } toxina de Frigge).- Es producida por los distintos tipos de Clostridium welchii, pero aparece en concentración elevada en cultivos (24 horas) de cepas de gangrena gaseosa humana.- Es una lecitinase, es decir desdobra lecitina en fosfocolina y estearil-oleil-glicérido.- En virtud de esto es hemolítica.- Produce la opalescencia de sueros y emulsiones de huevo.- Estas reacciones se producen en presencia de iones calcio y son inhibidas por citratos, fluoruros y fosfatos.-

Es letal inyectada por vía venosa, peritoneal e intramuscular.- Produce necrosis característica si se le inyecta subcutáneamente.-

La toxina puede ser dosada: por cantidad de hemólisis que en condiciones standard, produce una hemolisina "Caliente-frío"; o por estimación del grado de opalescencia que en iguales condiciones se produce en lecitovitulina (L.V.).- También puede ser dosada serologicamen

te, estimándola por la antitoxina.-

Toxina θ : (equivale a la α toxina de Prigge).- Es hemolítica para glóbulos rojos de numerosos animales de laboratorio, - no posee efecto en lecitovitelina, es letal y necrótica.- Es oxígeno lábil y termolábil; estas cualidades - la asemejan a la streptolisina O., con la cual posee - relación antigénica.- Es neutralizada por el colesterol y por el Rojo Congo.-

Toxina η : Producida solamente por la cepa Lechien de Weinberg -- (Tipo A.) es letal, no hemolítica y no necrótica.- Puede diferenciarse de la toxina α por diferencia en los valores de la neutralización del suero.- Ya que no es - hemolítica, probablemente no afecta la lecitovitelina, ni el suero humano.-

Toxina β : Producida por cepas del tipo B y C. aparece sobre todo en concentración elevada en los cultivos jóvenes.- Es termolábil, letal, y necrótica.- Es realmente inactiva da por la tripsina, y puede ser transformada en toxoide por acción del formol.-

Toxina γ : Su existencia es postulada para explicar las diferencias existentes entre valores neutralizantes de sueros tipo B y tipo C.- Es letal, pero no tiene poder hemolítico y necrótico.-

Toxina δ : Es producida en cultivos jóvenes de cepas tipo B, y - particularmente tipo C.- Es hemolítica para glóbulos - rojos de algunos animales.- Es probable que esta toxina sea letal, pero no es evidente su actividad necrótica.-

Toxina ξ : (corresponde al factor X de Wilsdon). Se encuentra en gran concentración en cultivos viejos (tres a cinco días) de cepas B y cepas D.- Tal cual se encuentra en el filtrado es termolábil, letal y necrótica.- Pero tratada con tripsina se transforma en la forma termolábil, mucho más tóxica, sin aumentar su poder de combinación.- Es en esta forma termolábil, como se la encuentra en el contenido intestinal de ovejas que sufren la disentería y la enterotoxemia infecciosa.-

Las tablas (*) que se insertan a continuación resumen las propiedades de las distintas toxinas.-

TABLA I

Toxinas presentes en los diferentes tipos de filtrados

<i>Filtrado Tipo.</i>	α	β	γ	δ	ϵ	η	θ
<i>A</i>	+++	-	-	-	-	(+)	+
<i>B</i>	+	+++	+	+	++	?	?+
<i>C</i>	+	+++	+	++	-	?	?+
<i>D</i>	+	-	-	-	+++	?	?+

(*) Tablas extraídas del artículo publicado por Oakley en el "Bulletin of Hygiene" del "Bureau of Hygiene and Tropical diseases" Vol. XVIII - N 10 - Oct. 1943.-

TABLA II.-

Principales propiedades de las distintas toxinas.

<i>Toxina</i>	<i>Hemolitica</i>	<i>Letal</i>	<i>Necrosante</i>	<i>Lecitinasa</i>	<i>Efecto del Calor</i>
α	+	+	+	+	<i>Termoestable.</i>
β	-	+	+	-	<i>Termolabil</i>
γ	-	+	-	-	
δ	+	+	-	-	
ϵ	-	+	+	-	<i>Filtrado del cultivo: Termoestable</i> <i>Jugo intestinal: Termolabil.</i>
η	-	+	-	-	
θ	+	+	+	-	<i>Termolabil.</i>

CONSIDERACIONES GENERALES

La θ toxina perfringens contenida en los cultivos de Clostridium welchii, tipo A., hemoliza los glóbulos rojos, y como - demostró Todd (1941), es lábil al oxígeno y está relacionada - con la streptolisina O, con la cual posee comunidad antigénica.-

En este trabajo nos propusimos demostrar las condiciones o factores que favorecen o inhiben la acción del oxígeno.- Además, como al parecer se trata de un sistema de óxido reducción, intentamos llegar experimentalmente a determinar de que tipo era el referido sistema, es decir, que sustancia o grupo de sustancias, rigen por cambios sucesivos esta clase de fenómenos.-

El primer punto que debimos resolver fué el siguiente: encontrar una sustancia reductora tal que, al ser adicionada a - la toxina, no permita la oxidación de ésta.- Así se puede mantener el material con poder hemolítico lo suficientemente elevado, como para medir sus fluctuaciones, cuando se somete la - toxina a otros procesos.-

Además, la toxina entera, es decir, el filtrado de los cultivos de Clostridium welchii, tipo A, posee una composición extremadamente compleja.- Las sustancias inertes que acompañan al principio hemolítico, producen muchas veces reacciones que interfieren a las de la hemolisina propiamente dicha.- Por esta - razón, el segundo punto que tratamos de resolver fué el siguiente: separar y purificar el principio hemolítico.- Para ello utilizamos los métodos clásicos de precipitación de la fracción proteica por acción del sulfato de amonio a saturación, y luego pu

rificación posterior de esta por el método de diálisis.- Así - se obtuvieron varias fracciones, que al ser tratadas por agentes reactivantes, tales como el hidrosulfito de sodio o el ácido tioglicólico, nos condujeron a resultados - en base a los - cuales podemos sugerir - la existencia de una sustancia particular, presente en las toxinas enteras, que permite la acción reactivadora del ácido tioglicólico, ya que al desaparecer esa sustancia, la acción es nula o contraria a la reactivación.-

Las experiencias de oxidación por otros agentes, tales como el iodo, o el ferricianuro de potasio, nos llevaron a demostrar que en estos casos, la inactivación de la toxina se - lleva a cabo en forma irreversible, es decir al ser tratada nuevamente con hidrosulfito de sodio o con ácido tioglicólico no - regenerar su capacidad hemolítica.- Estas experiencias se hicieron en base a las que ya habían efectuado C.V.Smythe y T.N. Harris (1940), con un determinado grupo de streptococos hemolíticos.-

La interpretación de los resultados de estas experiencias de oxidación, así como la individualización de la sustancia cuya existencia fué anteriormente sugerida, se hacen - muy dificultosas debido a que, como todavía el Clostridium welchii, se cultiva en medios de composición compleja, las conclusiones de las experiencias efectuadas con esta clase de filtrados pueden ser, a veces, erróneas o dispares.- Por eso creemos, que el estudio racional de estos sistemas podrá ser encarado - con mayores perspectivas de éxito cuando se llegue a cultivar -

el *Clostridium welchii*, en medios sintéticos.-

Se puede atribuir además, a esa extrema complejidad - en la composición de los filtrados, la inconstancia en los datos obtenidos cuando se trató de investigar la presencia de glutatión y citocromo.-

---oOo---

PREPARACION DEL MATERIAL Y METODO DE TITULACION DE
LA HEMOLISINA

Obtención de la θ toxina:

En un frasco Erlenmeyer de dos litros de capacidad, se colocan 600 mil. de "caldo básico".- Este se prepara con agua de carne a la que se adiciona 2 o/oo de fosfato disódico, 4 o/oo de cloruro de sodio, 2 o/o de peptona "Parke Davis", e hidróxido de sodio en cantidad suficiente para obtener un pH igual a 8,4.- El recipiente que posee un tapón de goma con sistema de tubos para lavado con hidrógeno, tubo para agregar hidróxido de sodio, y tubo para la siembra y toma de muestra, se esteriliza a 115° durante 20 minutos y se saca del autoclave aún caliente.- Se enfría hasta 37° bajo corriente de hidrógeno, producido en un aparato de Kipp y lavado con hidróxido de sodio y permanganato de potasio alcalino.- De esta forma se evita que el aire esté en contacto con el medio.- Se agrega luego la solución estéril de glucosa al 50 % en cantidad suficiente para que la concentración del medio sea 1 o/o.- Se coloca en un baño a 37° y se siembra un cultivo fresco (12 horas), de perfringens 107, cultivada en el mismo medio y en tubo de Hall.-

Manteniendo siempre la temperatura a 37°, se hace pasar continuamente corriente de hidrógeno, y ya a la primera hora comienza a notarse el desarrollo.- Se toman muestras cada 15 minutos aproximadamente, se titulan con "fenol red" y se acondiciona el pH entre 7,6 y 7,8, por agregado de solución estéril de hidróxido de sodio al 20 o/o.- En general entre las 5 y 6 horas, la -e

operación está terminada, entonces se hace pasar hidrógeno durante 15 minutos más, y luego se deja el aparato bajo esta presión de hidrógeno.- Al terminar la incubación a 37°, el cultivo posee toxina α y toxina θ , y sólo al cabo de uno a tres días desaparece la toxina α , en tanto que la toxina θ disminuye poco o nada su actividad.- Se centrifuga luego para separar la mayoría de los gérmenes a 4.800 revoluciones por minuto, durante 30 minutos y se filtra por Seitz, obteniéndose así un filtrado muy tóxico de θ toxina.-

En este trabajo, los términos θ toxina, toxina θ entera, o filtrado perfringens, que son equivalentes, significan el material estéril obtenido por el procedimiento anteriormente citado.-

Técnica del dosaje de la hemolisina.-

En un tubo de ensayo se colocan 0,2 mil. de filtrado original y 9,8 mil. de solución fisiológica, con lo cual la toxina queda diluída 1/50.-

Se dispone una serie de tubos y se introduce en cada uno de ellos, menos en el primero, 0,5 mil. de solución fisiológica.- Luego se coloca: en el primer tubo 0,5 mil. de toxina 1/50; en el próximo 0,5 mil. de toxina 1/50; la cual con los 0,5 mil. de solución fisiológica queda diluída a 1/100, se toman 0,5 mil. de ésta y se coloca en el siguiente tubo y así sucesivamente.- Luego se colocan en cada tubo 0,5 mil. de suspensión de glóbulos rojos de ovjea en solución fisiológica.- De esta manera en el primer tubo queda diluída la toxina al 1/100, en -

el segundo al 1/200, en el tercero al 1/400 y así sucesivamente.-
Se introducen luego los tubos en un baño a 37°, y a la media hora se hace la lectura de la hemólisis, en la cual se tomaron en cuenta los siguientes términos:

-: Cuando al centrifugar el contenido, la solución fisiológica aparece incolora.-

FH: cuando al centrifugar la muestra, la solución fisiológica aparece levemente teñida y hay sedimentación de la casi totalidad de los glóbulos rojos.-

½H: significa que la mitad de los glóbulos rojos sedimentan, y la otra mitad se ha hemolizado.-

CH: cuando solamente una pequeña parte de los glóbulos rojos ha quedado sin hemolizar.-

H: representa la hemólisis de la totalidad de los glóbulos rojos.-

PARTE EXPERIMENTAL

Tratamiento de la θ toxina con cianuro de potasio:

Se trató de buscar primeramente, la concentración óptima de cianuro de potasio, necesaria para evitar la destrucción del poder hemolítico de la toxina.- Los resultados obtenidos en un número considerable de operaciones, pueden resumirse en los datos de una de las experiencias tomada como tipo

<i>Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lectura de la Hem.</i>	<i>Toxina Testigo Sin tratar</i>	<i>Toxina + CNK. Equivalente N/10</i>	<i>Toxina + CNK. Equivalente N/50</i>	<i>Toxina + CNK Equivalente N/100</i>
<i>Valor Original</i>	<i>1/6400 H</i>	<i>—</i>	<i>—</i>	<i>—</i>
<i>2 dias.</i>	<i>1/200 H</i>	<i>1/6400 CH</i>	<i>1/6400 H</i>	<i>1/3200 PH</i>
<i>5 dias.</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/3200 PH</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/800 H</i>

La técnica operatoria consistió en agregar la cantidad de cianuro de potasio sólido necesaria para obtener la concentración deseada.-

Como se puede ver la menor concentración más apropiada para conservar el poder hemolítico de la toxina, es la equivalente a una solución de cianuro de potasio N/50.- Por eso, a partir de este momento, cuando en este trabajo se cite a la toxina tratada con cianuro de potasio, se referirá siempre a la concentración anteriormente citada.-

La protección del valor hemolítico por acción del cianuro de potasio, fué ampliamente confirmada en una serie de ex-

periencias complementarias, de las cuales cito a continuación - los valores de dos de ellas, que he tomado como ejemplo

Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lectura de la Hemolisis.	Toxina Testigo	Toxina + CNK. Equivalente %50	Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lectura de la Hemolisis.	Toxina Testigo.	Toxina + CNK. Equivalente %50
Valor Original	1/3200 H	—	Valor Original	1/6400 CH	—
1 día	1/800 1/2 H	1/3200 H	1 día.	1/1600 CH	1/3200 H
2 días	1/200 1/2 H	1/3200 H	3 días	1/100-	1/3200 PH
3 días	1/100-	1/3200 1/2 H	4 días.	—	1/1600 CH
6 días	—	1/1600 H	5 días	—	1/1500 CH
8 días	—	1/1600 PH	6 días.	—	1/1600 PH.

Se debe hacer notar, que si se efectúa la titulación de la toxina, inmediatamente después de haberle agregado el cianuro de potasio, se puede observar en la mayoría de los casos, una moderada exaltación del valor hemolítico del filtrado.-

Tratamiento de la Θ toxina con otras sustancias inhibidoras de enzimas.-

Las experiencias llevadas a cabo en forma similar a la anterior, pero utilizando sulfuro de sodio, uretano y azida sódica como agentes inhibidores, demostraron que estas tres sustancias no poseen propiedades conservadoras, ya que el poder hemolítico disminuyó en todos los casos en forma aproximadamente análogo

ga a como lo hace la toxina original.-

En las tablas de valores dadas a continuación, pueden verificarse los resultados de estas experiencias

<i>Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lect. de la Hem.</i>	<i>Toxina Testigo Sin tratar.</i>	<i>Toxina + Uretano Equivalente $\frac{1}{10}$</i>	<i>Toxina + Uretano Equivalente $\frac{1}{50}$</i>	<i>Toxina + Uretano Equivalente $\frac{1}{100}$</i>
<i>Valor Original</i>	$\frac{1}{6400} H$	—	—	—
<i>2 días</i>	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{400} CH$	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{200} CH$
<i>5 días</i>	$\frac{1}{100} -$	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{100} H$	$\frac{1}{100} -$

<i>Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lect. de la Hem.</i>	<i>Toxina Testigo Sin tratar.</i>	<i>Toxina + $N_3 Na_2$ Equivalente $\frac{1}{10}$</i>	<i>Toxina + $N_3 Na_2$ Equivalente $\frac{1}{50}$</i>	<i>Toxina + $N_3 Na_2$ Equivalente $\frac{1}{100}$</i>
<i>Valor Original</i>	$\frac{1}{6400} H$	—	—	—
<i>2 días</i>	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{200} CH$	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{200} H$
<i>5 días</i>	$\frac{1}{100} -$	$\frac{1}{100} -$	$\frac{1}{100} -$	$\frac{1}{100} -$

<i>Periodo transcurrido entre el tratamiento y la lect. de la Hem.</i>	<i>Toxina Testigo Sin tratar.</i>	<i>Toxina + SN_{a2} Equivalente $\frac{1}{10}$</i>	<i>Toxina + SN_{a2} Equivalente $\frac{1}{50}$</i>	<i>Toxina + SN_{a2} Equivalente $\frac{1}{100}$</i>
<i>Valor Original.</i>	$\frac{1}{6400} H$	—	—	—
<i>2 días.</i>	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{400} CH$	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{200} CH$
<i>5 días</i>	$\frac{1}{100} -$	$\frac{1}{200} H$	$\frac{1}{100} H$	$\frac{1}{100} -$

Inactivación de la θ toxina por el aire:

Estas experiencias se llevaron a cabo con θ toxina original y con θ toxina tratada por cianuro de potasio.- La técnica consiste en pasar durante un tiempo determinado (nosotros empleamos 30 minutos), una corriente de aire que burbujea en la toxina. Así puede demostrarse que la θ toxina tratada por cianuro de potasio, resiste perfectamente la acción del oxígeno del aire.- En cambio la θ toxina original posee un comportamiento muy irregular, en efecto, algunas veces, se destruye completamente, y otras poses sólo una leve atenuación.-

En el cuadro siguiente pueden verse las diferencias entre algunas toxinas tratadas:

<i>Tiempo Transcurrido entre el pasaje de aire y la lect. de la Hem.</i>	<i>Toxina.</i>	<i>Toxina+CN</i>	<i>Toxina</i>	<i>Toxina+CN</i>	<i>Toxina.</i>	<i>Toxina+CN</i>	<i>Toxina</i>	<i>Toxina+CN</i>
<i>Valor Original.</i>	<i>1/1600 H</i>		<i>1/6400 CH</i>		<i>1/1600 H</i>		<i>1/3200 H</i>	
<i>1 día.</i>	<i>1/200 H</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/200 1/2 H</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/3200 H</i>
<i>2 días.</i>	<i>1/100 1/2 H</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/3200 CH</i>
<i>3 días.</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>—</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 CH</i>	<i>1/800 1/2 H</i>	<i>1/3200 CH</i>
<i>4 días.</i>	<i>—</i>	<i>1/800 CH.</i>	<i>—</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/800 PH</i>	<i>1/1600 CH</i>	<i>1/400 H</i>	<i>1/3200 PH</i>

Purificación de la θ toxina por precipitación y diálisis:

Este ensayo se llevó a cabo por el método común, es decir, adición de sulfato de amonio sólido, en cantidad suficiente para saturar la muestra, agitación, reposo, decantación y se-

paración del precipitado, y dilución del mismo en solución fisiológica.- En esta forma se puede separar la parte de la toxina que precipita con sulfato de amonio, que como se demuestra sencillamente por un dosaje, contiene la hemolisina.-

La segunda fase en la purificación de la toxina, consiste en liberar a ésta, basándonos en sus propiedades coloidales, de las sustancias que se separan por diálisis.- Se aplicó en esta operación el método común, y salvo indicación al respecto, siempre que en este trabajo se cite la diálisis de la toxina o de sus fracciones, se refiere a la efectuada dejando a aquella en dializador durante 24 horas, contra agua corriente.-

La toxina purificada en esta forma, pierde en parte su capacidad hemolítica, pero esta pérdida es más acentuada cuando en vez de tratar previamente la toxina con cianuro de potasio, se manipula con el filtrado original.-

El cuadro I, insertado a continuación, nos muestra las fluctuaciones del valor hemolítico durante los intentos de purificación de una de las toxinas tomada como tipo, a la cual se le aplicó el método de precipitación y diálisis.-

Conviene aclarar que la nomenclatura del cuadro siguiente, cuando se cita toxina precipitada por sulfato de amonio, más cianuro de potasio y toxina precipitada por sulfato de amonio dializada más cianuro de potasio, se trata de fracciones a las cuales se le ha agregado, cianuro de potasio en la misma concentración que se usa para la toxina entera.-

CUADRO I

DIA	θ TOXINA	θ Toxina. + CNK.	θ Toxina. PPDA por $SO_4(NH_4)_2$.	θ Toxina. PPDA por. $SO_4(NH_4)_2$ + CNK.	θ Toxina PPDA por $SO_4(NH_4)_2$ Dializada.	θ Toxina PPDA por $SO_4(NH_4)_2$ Dializada. + CNK.
1º	1/6400 PH	1/6400 1/2 H	—	—	—	—
2º	1/1600 H	1/6400 1/2 H	1/3200 H	—	—	—
3º	1/800 H	1/6400 PH	1/800 H	1/1600 H	1/800 H	1/800 H
4º	1/800 H	1/3200 CH	1/400 CH	1/1600 H	1/200 H	1/800 H
6º	1/400 1/2 H	1/3200 CH	1/200 H	1/1600 H	1/200 H	1/800 H
7º	1/200 H	1/3200 CH	1/100 H	1/1600 H	1/100 H	1/800 H.
8º	1/200 CH	1/3200 H	1/100 H	1/1600 H	1/100 PH	1/800 H
9º	1/100 H	1/3200 CH	1/100-	1/1600 1/2 H	1/100 PH	1/800 1/2 H
10º	1/100-	1/3200 CH	1/100-	1/1600 1/2 H	1/100-	1/800 PH
13º	1/100-	1/3200 PH	1/100-	1/1600 PH	1/100-	1/800 PH.

Regeneración del poder hemolítico de toxinas inactivadas por oxidación.-

Como ya se ha citado, en el año 1926, Neill, descubrió que una de las toxinas del *Clostridium welchii*, tenía la propiedad de ser lábil al oxígeno.- Esta toxina fué identificada con la θ toxina *perfringens* por Todd (1941).-

Estos autores estudiaron también la acción de sustancias reductoras, para restituir el poder hemolítico de las toxinas previamente inactivadas por oxidación.-

Nosotros estudiamos la acción de dos de esos agentes reductores que poseen propiedades de reactivación, son ellos el hidrosulfito de sodio y el ácido tioglicólico.-

Las experiencias con hidrosulfito de sodio se llevaron a cabo de la siguiente manera: se trató primeramente de buscar la concentración óptima de hidrosulfito de sodio (agente reductor), necesaria para obtener una regeneración más efectiva del título hemolítico de la toxina.-

Para ello se ensayaron concentraciones de hidrosulfito de sodio que variaban entre el 3 % y el 1 o/oo, y como puede apreciarse en el cuadro siguiente, la concentración más apropiada resultó ser la que equivale a una solución de hidrosulfito de sodio al 1 o/oo.-

Concentración de $\text{SO}_4 \text{NH}_2$.	Toxina	Toxina precipitada por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.	Toxina precipitada por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dializada
3%	1/800 H	1/100 H	1/100 -
1%	1/800 H	1/100 H	1/100
5‰	1/3200 H	1/200 H	1/100 -
2.5‰	1/3200 H	1/400 1/2 H	1/400 PH
1.6‰	1/3200 H	1/400 H	1/800 PH
1.25‰	1/6400 PH	1/800 1/2 H	1/800 1/2 H
1‰	1/6400 H	1/800 H	1/800 1/2 H.

Este cuadro, que representa los resultados de una de las numerosas experiencias efectuadas, nos permite demostrar que la activación es más acentuada -aunque a veces muy leve-, en la toxina entera que en la toxina precipitada por sulfato de amonio y a su vez en ésta es mayor que en la misma fracción que previamente ha sido dializada.- Podemos afirmar entonces, que a medida que purificamos la toxina, disminuye su aptitud de reactivación por el hidrosulfito de sodio, es decir, la inactivación que ha experimentado va siendo cada vez más irreversible.-

La técnica seguida en estos ensayos, fué la siguiente: se hace una solución al 10 % de hidrosulfito de sodio, en solución buffer de fosfato disódico M/7,5 y fosfato dipotásico M/7,5 cuyo pH es igual a 7.- Se colocan luego en un tubo de ensayo, - 9,9 mil.de toxina y 0,1 mil. de la solución de hidrosulfito de -

sodio preparada anteriormente, se tapa con parafina y se lleva a estufa a 37° durante 30 minutos.-

La reactivación de la toxina con ácido tioglicólico se estudió en la misma forma que la anterior.- El método utilizado fué el siguiente: en un tubo de ensayo se colocan 9,9 mil. de toxina y 0,1 mil. de ácido tioglicólico, se deja 30 minutos a la temperatura ambiente y se hace la lectura de la hemólisis.-

Se da a continuación un cuadro comparativo de las toxinas tratadas con hidrosulfito de sodio y con ácido tioglicólico:

<i>Tratamiento.</i>	<i>TITULOS DE LAS DIVERSAS TOXINAS TRATADAS</i>						
<i>Valor Original</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100H</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100PH</i>	<i>1/100H</i>	<i>1/100-</i>
<i>S₂O₄Na₂.</i>	<i>1/3200PH</i>	<i>1/3200PH</i>	<i>1/3200H</i>	<i>1/6400H</i>	<i>1/6400H</i>	<i>1/12800PH</i>	<i>1/3200H</i>
<i>Acido Tioglicólico.</i>	<i>1/1600PH</i>	<i>1/800PH</i>	<i>1/1600H</i>	<i>1/6400PH</i>	<i>1/3200PH</i>	<i>1/6400PH</i>	<i>1/800H</i>

Como puede apreciarse, el poder de reactivación del hidrosulfito de sodio es mayor que el del ácido tioglicólico.-

Las experiencias con ácido tioglicólico, al actuar éste sobre las distintas fracciones, nos permitieron demostrar:

1ª) La toxina precipitada por sulfato de amonio, que como sabemos se activa por acción del hidrosulfito de sodio, no se activa por el ácido tioglicólico, y es más, si la toxina precipitada por el sulfato de amonio a tratar posee título hemolítico dosable (por más bajo que este sea), lo pierde completamente.- Debe hacerse notar asimismo que en todos los casos, esta incapacidad de reactivación está acompañada con la aparición de un precipitado muy tenue.-

A continuación puede observarse el cuadro con los datos que se obtuvieron en esta serie de experiencias:

<i>Tratamiento de la Toxina PPD-R. por $SO_4(NH_4)_2$</i>	<i>TITULOS DE LAS MUESTRAS TRATADAS.</i>				
<i>Valor Original</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/400 H</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/200 H</i>
<i>$S_2 O_4 Na_2$</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 H</i>
<i>Acido Tioglicolico</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>

2-) El sulfato de amonio que impurifica la toxina precipitada por el mismo, es completamente ajeno a este mecanismo, en efecto, si se le agrega a la toxina entera una cantidad de sulfato de amonio análoga a la que posee la toxina precipitada, la reactivación se lleva a cabo en la misma forma que lo hace para la toxina entera.-

Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro siguiente:

<i>Muestra tratada por Ac. Tioglicólico</i>	<i>TITULOS DE LAS MUESTRAS TRATADAS</i>				
<i>Valor Original</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100 H</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100 CH</i>
<i>Toxina.</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 CH</i>	<i>1/1600 1/2 H</i>	<i>1/3200 PH</i>
<i>Toxina + $SO_4(NH_4)_2$</i>	<i>1/800 CH</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 1/2 H</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/3200 PH</i>

3ª) Si a la toxina precipitada por sulfato de amonio se le agrega el líquido residual, es decir la parte que no ha precipitado originariamente con sulfato de amonio, se obtienen valores hemolíticos que aunque a veces no se aproximan mucho a los de la toxina original reactivada por el mismo método, nos sirven para confirmar que: la sólo presencia del líquido residual de precipitación, posibilita la reactivación de la toxina precipitada por sulfato de amonio por acción del ácido tioglicólico.-

Como se puede ver en el cuadro que sigue, una serie de experiencias corroboraron estos resultados.-

(ver el cuadro en la página 28)

<i>Muestras tratadas por Acido Tioglicólico.</i>	<i>TITULOS DE LAS MUESTRAS TRATADAS</i>			
<i>Valor Original.</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>
<i>Toxina.</i>	<i>1/800 1/2 H</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 H</i>
<i>Toxina PPDA por SO₄ (NH₄)₂ + Liq. Resid.</i>	<i>1/800 PH</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/800 PH</i>	<i>1/800 1/2 H</i>
<i>Toxina PPDA por SO₄ (NH₄)₂</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100 -</i>
<i>Liquido Residual.</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>

4ª) El agregado a la toxina precipitada por sulfato de amonio del caldo que se usa para el cultivo del *Clostridium welchii*, protege también la activación de la fracción citada por acción del ácido tioglicólico.- De este hecho deducimos que en el caldo original, existe una substancia que permite la reactivación de la toxina precipitada por sulfato de amonio por acción del ácido tioglicólico.- Además, como al agregarse glucosa o peptona -- "Parke Davis", en las proporciones en que se hallan en el caldo, la toxina precipitada no adquiere la propiedad de reactivarse, - puede afirmarse que esa substancia se halla en el agua de carne.-

El cuadro siguiente resume los datos de una de las experiencias tomada como tipo.-

<i>Muestras tratadas por Acido Tioglicólico.</i>	<i>TITULOS DE LAS MUESTRAS TRATADAS.</i>			
<i>Valor Original</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>
<i>Toxina.</i>	<i>1/800 1/2 H</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 H</i>
<i>Toxina PPDA por SO₄(NH₄)₂ + Caldo.</i>	<i>1/800 H</i>	<i>1/1600 PH</i>	<i>1/800 1/2 H</i>	<i>1/1600 PH</i>
<i>Toxina PPDA por SO₄(NH₄)₂ + Peptona.</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>
<i>Toxina PPDA por SO₄(NH₄)₂ + Glucosa.</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>

5) Si se agrega después del ácido tioglicólico o junto a él, la cantidad de hidrosulfito de sodio, necesaria para reactivar la toxina precipitada por sulfato de amonio, dicha reactivación no se produce.- Este hecho indicaría que entre el ácido tioglicólico y el principio hemolítico, se forma un compuesto, que no permite la acción ulterior de otro agente, y que muy bien puede considerarse relacionado directa o indirectamente, con el precipitado que como ya hemos dicho, se forma al poner en contacto la toxina precipitada por sulfato de amonio y el ácido tioglicólico.-

- - -

Cuando se estudió la fracción obtenida por diálisis, pudimos observar que se presentaban muchas dificultades.- En primer lugar, los resultados no fueron concordantes, pues como nos demuestra la tabla de valores adjunta, aunque la mayoría de las experiencias, la toxina dializada no se reactivó con el ácido tioglicólico, hubo sin embargo, algunos resultados discordantes.-

<i>Tratamiento por Acido Tioglicólico.</i>	<i>TITULOS HEMOLITICOS LEIDOS</i>			
<i>Valor Original.</i>	<i>1/200 H</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/200 H</i>
<i>Toxina.</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/3200 H</i>	<i>1/3200 H</i>
<i>Toxina Dializada.</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/100 -</i>	<i>1/400 H.</i>

Ahora bien, si es que efectivamente la toxina dializada, no se reactiva por el ácido tioglicólico, como puede suponerse, ya que la mayoría de las experiencias lo atestiguan, podría realizarse la siguiente experiencia: dializar la toxina contra un volumen medido de agua; luego evaporar este agua a temperatura inferior a 37° (para evitar que cualquier sustancia se inhiba), hasta que se obtenga un volumen del líquido deseado.- Al agregar este líquido a la toxina dializada, que ha perdido la capacidad de reactivarse por el ácido tioglicólico, volvería a hacerlo, ya que se le agregaría nuevamente la sustancia que protege el mecanismo de reactivación.-

Es necesario aclarar que se parte de la base, al bosquejar esta experiencia, de que no es una destrucción de la toxina por diálisis (ya que se reactiva por el hidrosulfito de sodio) sino la pérdida de una sustancia que protege el mecanismo de reactivación.-

Esta experiencia realizada solamente en dos oportuni-

dades, dió resultados contradictorios, y su realización debió abandonarse por falta de material necesario para ejecutarla.-

- - -

Inactivación de la θ toxina perfringens por agentes oxidantes. Acción del iodo y del ferricianuro de potasio.

Estas experiencias se ejecutaron de acuerdo a la técnica adoptada por C.V. Smythe y T.N. Harris, en un estudio sobre la inactivación de algunas streptolisinas.-

La técnica seguida se puede describir así: se trata la θ toxina con 0,2 mil. de solución 0,5 M de ferricianuro de potasio por mil. y se deja 20 minutos en reposo.- O se trata la toxina con 0,5 mil. de solución 0,1 N de iodo en ioduro de potasio - por mil. de toxina y se deja 30 minutos en resposo.-

Se leen a continuación los títulos hemolíticos, los resultados se resumen en el cuadro siguiente:

<i>Tratamiento de la Toxina.</i>	<i>TITULOS HEMOLITICOS LEIDOS</i>			
<i>Valor Original.</i>	<i>1/1600 H</i>	<i>1/6400 H</i>	<i>1/2800 H</i>	<i>1/800 H</i>
<i>Toxina + Ferricianuro</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>
<i>Toxina + Iodo.</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>	<i>1/100-</i>

Como se puede ver, las toxinas, cualquiera sea el título hemolítico que posean, lo pierden totalmente por la acción de estos oxidantes.-

Se pudo demostrar también que si una toxina tratada con iodo o con ferricianuro de potasio, era luego sometida a la acción del hidrosulfito de sodio o del ácido tioglicólico, la reactivación no se produce.- La experiencia demuestra entonces, en estos casos, que la inactivación de la Θ toxina perfringens es irreversible.-

----000---

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La θ toxina perfringens que como ya sabemos, hemolisa los glóbulos rojos de muchos animales de laboratorio, pierde esta propiedad cuando se la expone al aire, durante un determinado tiempo.-

Ahora bien, como nosotros a pesar de emplear siempre las mismas cepas y el mismo tipo de filtrado, obtuvimos períodos de inactivación (para las distintas muestras de toxinas) bastante diferentes, pensamos que este hecho debe atribuirse a la complejidad del medio.-

La θ toxina inactivada por el aire, puede restituir su título hemolítico original cuando es tratada convenientemente con un agente reactivante, tal como el hidrosulfito de sodio o el ácido tioglicólico, y en este caso nos encontramos entonces, ante una inactivación reversible de la toxina.- En cambio, cuando la toxina es inactivada por acción del iodo o del ferricianuro de potasio, pierde la propiedad de reactivarse después de haber sido inhibida, y por lo tanto ha sufrido una inactivación irreversible.-

Cuando se purifica el filtrado, (por precipitación o diálisis), puede demostrarse que los agentes reactivantes elevan el título hemolítico de la toxina purificada, aunque en forma menos marcada que como lo hacen cuando actúan sobre la toxina cruda.- Esto demuestra que durante el proceso de purificación, la toxina sufre los dos tipos de atenuaciones; la reversible por acción del aire, y un tipo de atenuación irreversible.-

El cianuro de potasio protege a la toxina cruda o purificada de la acción inhibitoria del aire, y esta protección persiste cuando el filtrado es sometido a procesos de purificación (precipitación o diálisis).- En cambio el sulfuro de sodio y la azida sódica, que en los procesos biológicos habituales poseen una acción paralela al cianuro de potasio, en este caso no la cumplen, ya que agregados a la toxina en proporciones convenientes no la protegen en absoluto de la acción inactivadora del aire.- Los ensayos efectuados con uretano nos demostraron que esta substancia, tampoco es capaz de proteger a la toxina de la acción del aire.-

Cuando se hace actuar sobre la toxina bruta el hidrosulfito de sodio o el ácido tioglicólico, poseen un buen poder de reactivación sobre ella, es decir, el título hemolítico de la toxina vuelve a ser igual al que originariamente tenía.- Pero cuando el filtrado se purifica, (por precipitación o diálisis), puede ser solamente reactivado por el hidrosulfito de sodio, pues el ácido tioglicólico es incapaz de reactivar la toxina precipitada por sulfato de amonio.-

Ahora bien, como al tratar la toxina precipitada por sulfato de amonio con ácido tioglicólico, aparece un precipitado tenue se puede asociar esta incapacidad de reactivación a la aparición del precipitado.-

Esta idea se basa en la siguiente experiencia: si se agrega agua de carne a la toxina precipitada por sulfato de amonio, ésta adquiere la propiedad de reactivarse por el ácido tioglicólico, y además el precipitado tenue no aparece.-

Si se adiciona después o junto con el ácido tioglicólico, hidrosulfito de sodio, pierde éste también la propiedad de reactivar la toxina.-

En base a estos hechos, podemos deducir, que el ácido tioglicólico, posee sobre la toxina precipitada por sulfato de amonio alguna de las siguientes acciones: puede destruir la toxina, o puede inhibir el grupo hemolítico, o simplemente puede precipitar junto a la hemolisina.-

De acuerdo a lo precedentemente expuesto, podemos sugerir la existencia de una substancia que no precipita por sulfato de amonio a saturación, que está contenida en el agua de carne, y cuya presencia en la toxina precipitada por sulfato de amonio, hace posible su reactivación por acción del ácido tioglicólico.- El mecanismo de acción de esta substancia no pudo ser demostrado.-

Esta substancia puede ser la misma que pasa por diálisis, cuando se efectúa esta operación sobre la toxina cruda.- Las experiencias efectuadas para obtener la identificación de estas dos substancias, dieron al principio resultados positivos, pero luego los datos obtenidos fueron contradictorios.- Como cuando los resultados no eran del todo concluyentes las experiencias debieron suspenderse por falta de material, no podemos afirmar la identidad de las dos substancias.-

CONCLUSIONES

1ª) La θ toxina perfringens es inactivada por el aire - en forma reversible.- En cambio, otras sustancias con mayor potencial de oxidación, tales como el iodo o el ferricianuro de potasio, la inactivan en forma irreversible.-

2ª) El cianuro de potasio en concentración mínima óptima N/50, protege a la toxina de la acción inhibidora del aire.- En cambio, el sulfuro de sodio, uretano y azida sódica, no poseen acción alguna sobre la toxina.-

3ª) La toxina bruta puede ser reactivada por el hidrosulfito de sodio y por el ácido tioglicólico.- Cuando se la purifica, (por precipitación o diálisis) se reactiva por el hidrosulfito de sodio, pero no por el ácido tioglicólico.-

4ª) Si a la toxina purificada por precipitación por sulfato de amonio, se le agrega agua de carne, adquiere la propiedad de reactivarse por acción del ácido tioglicólico.-

5ª) Sugerimos la existencia de una sustancia, cuya presencia permite la reactivación de la toxina precipitada por sulfato de amonio por acción del ácido tioglicólico.- Esta sustancia - que no precipita por sulfato de amonio a saturación, está contenida en el agua de carne.-

BIBLIOGRAFIA

D. U. N. A.

- (1906-7) Herter, C.A.; J.Biol. Chem. V.2, Pag. 1.-
- (1915) Simonds, J; Monogr. Rockefeller Inst. 5.-
- (1917 a) Bull, C.G. y Pritchett, I.W.; J. Exper. Med. 26,119.-
- (1917 b) " " " " " " ; " " " 26,867.-
- (1917 c) " " " " " " ; J.Amer.Med.Ass. 68,1815.-
- (1917) De Kruif, P.H., Adams, T.W., Ireland, P.M.; J.Inf.Dis. 21,580.-
- (1917) De Kruif, P.H., Bollman, J.L.; J.Inf.Dis. 21,588.-
- (1917) Ouranoff, A.; Comp.Rend. Soc. Biol. 80,706.-
- (1920 a) Weinberg, N. y Nasta, M.; Ann. Inst.Pasteur. 34,690.-
- (1920 b) " " " " " ; Comp.Rend.Acad.Sci. 170,1019.-
- (1922) Kojima, K; Biochem.Ztschr. 128,519.-
- (1922) Henry, H; J.Path.Bact. 25,1.-
- (1923) " " " " " 26,497.-
- (1923) Wuth, O.; Biochem. Ztschr. 142,19.-
- (1926) Neill, J.; Journal Exptl.Med. 44,215.-
- (1926) Kendall, A.I. y Schmitt, F.O.; J.Infect.Dis. 39,250.-
- (1927) Reed, G.B., Orr, J.H. y Campbell,W.A.; J.Inf.Dis.41,434.-
- (1928) Dalling, T.; Handbk. Ann.Congr.Nat.Veter.Med.Ass.Newcastle.
- (1929 a) Weinberg, N. y Barotte, J.; Comp.Rend.Soc.Biol. 100,21.-
- (1929 b) " " " " " " " " " 100,733.-
- (1929 c) " " " " " ; Ann.Inst.Pasteur. 43,453.-
- (1930 a) " " " Combiesco; " " " 45,457.-
- (1930 b) " " " " ; Comp.Rend.Soc.Biol. 103,1091.-
- (1930 a) Mc.Ewen, A.D.; Veter.Rec., N.S. 10,71.-
- (1930 b) " " " " ; J.Comp.Path. Therap. 43,1.-

