

Tesis de Posgrado

Inactivación de la tita-Hemolisina del clostridium welchii tipo A, por mecanismos biológicos

De Simone, Corina

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:

De Simone, Corina. (1944). Inactivación de la tita-Hemolisina del clostridium welchii tipo A, por mecanismos biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0370_DeSimone.pdf

Cita tipo Chicago:

De Simone, Corina. "Inactivación de la tita-Hemolisina del clostridium welchii tipo A, por mecanismos biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1944. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0370_DeSimone.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICAS Y NATURALES

1944

*INACTIVACION DE LA α -HEMOLISINA DEL CLOSTRIDIUM WELCHII

TIPO A, POR MECANISMOS BIOLÓGICOS*

T E S I S

Para optar al título de Doctor en Química

C O R I N A D E S I M O N E

Tesis: 370

1944

Señores Profesores:

Presento a vuestra consideración y benevolencia este trabajo que dará término a mis estudios universitarios.-

Antes de entrar en materia deseo manifestar mi más profundo agradecimiento al Profesor Doctor Alfredo Sordelli por el honor que me ha dispensado al acompañarme en esta tarea, por su gentileza al poner a mi disposición los laboratorios del Instituto Bacteriológico "Carlos Malbrán" y sobre todo por sus sabios y provechosos consejos que siempre me han guiado en este primer y por lo tanto difícil trabajo.-

Al Doctor Venancio Deulofeu, agradezco sinceramente sus indicaciones que han sido ayuda valiosa para el desarrollo de las investigaciones efectuadas y la feliz terminación de las mismas.-

A los Jefes y Técnicos del Instituto Bacteriológico que de una manera u otra me han facilitado la tarea, toda mi gratitud.-

Un sincero reconocimiento hacia los profesores que supieron guiarme a través de toda mi carrera universitaria.-

Capítulo ITOMINAS DEL CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

La primera descripción completa del *Clostridium welchii* o *Bacilo perfringens* fué hecha por Welch y Nuttal, quienes lo aislaron de un cadáver.- (1892)

Desde ese momento su acción patógena en el organismo ha sido atribuida a diversos productos: el ácido butírico, producido en el cultivo, fué considerado como la causa de las lesiones de la gangrena gaseosa.-

También se creía que el gas producido en los tejidos, tenía importancia en el desarrollo y generalización de la infección.-

Pero en 1906-1907 se habla de una hemolisina termoestable (Herter) aunque recién en 1917 se encontró que el *Cl. welchii* por desarrollo anaeróbico en condiciones adecuadas, produce una "exotoxina letal" (Bull y Britchett) (1).-

En ese mismo año De Fruif, Adams, Ireland (2), mostraron que todas las cepas de *Cl. welchii* examinadas producían una toxina, pero que la actividad de los filtrados era variada.-

A. Gurantoff (1917) (3) informó que una "hemolisina" muy activa era producida por muchas cepas de ese organismo. Más tarde (1920), Weinberg y Kasta (4) se ocuparon de la misma y observaron que la proporción en filtrados de cepas distintas, varía considerablemente y le atribuyeron un papel importante en las intoxicaciones bacterianas. Ciertas propiedades de esta hemolisina fueron descubiertas por Ruth (1923).-

Trabajando con *Cl. welchii* aislado del hombre, Henry (1923) hizo una distinción entre una "miotoxina letal" y una "hemotoxina".

También Neill (1926) (5) encontró en filtrados del mismo organismo (probablemente tipo A-) una "hemolisina" que perdía su poder hemolítico cuando se exponía a la acción del aire, pero tratada luego por agentes reductores lo recuperaba.-

En el año 1929 Weinberg y Barotte (6) sugirieron que los filtrados del *Cl. welchii* (tipo A-) contenían dos toxinas: una "hemolítica" y otra "letal". En cambio Schnayerson y Samuels (1930-) (7) demostraron que en ese filtrado dos componentes hemolíticos A y B estaban presentes, que el componente A actuaba "in vitro" y algo "in vivo", que la rapidez de acción era distinta para A y B, y que no podían separarse.

Hasta 1923 sólo se habían estudiado las cepas aisladas de origen humano; con la investigación de cepas aisladas de origen animal la complejidad de los componentes de la toxina, se hizo mucho más marcada.-

Colling (1928) (8) aisló el "bacilo disentérico" del cordero, el cual era cultural y morfológicamente semejante al *Cl. welchii*; sin embargo su toxina no neutraliza la antitoxina del clásico *Cl. welchii*, pero su antitoxina neutraliza la toxina del *perfringens* humano, tan bien como la propia.-

De ovejas enfermas de una toxemia llamada "struck" se aisló otro organismo semejante al bacilo *perfringens* (*Cl. welchii*), se le designó "bacilo paludis" (Mac Swen) 1929 (8); la toxina de este organismo no neutraliza la antitoxina del *perfringens* clásico y su antitoxina no neutraliza tampoco la toxina *perfringens*.-

Investigaciones más completas de anaerobios, que conciernen a enfermedades de oveja, dieron como resultado el aislamiento de un cuarto organismo parecido al *perfringens*. Esto fué realizado por

Bennetts (1932) en ovejas que morían de "enterotoxemia". Este organismo difiere de las otras formas conocidas del *perfringens* en que su toxina, es neutralizada solamente por su antitoxina; ha sido llamado "bacillus ovitoxicus".-

Wilsdon (1931-32-33) realizó un estudio comparativo de los organismos semejantes al *Cl. welchii* y encontró que podían ser clasificados de acuerdo a las relaciones de toxina/antitoxina en la siguiente forma:

- 1) Tipo A: "*Cl. welchii*", de origen humano.-
- 2) Tipo B: "bacilo agni", de la disentería del cordero.-
- 3) Tipo C: "bacilo paludis".-
- 4) Tipo D: "un organismo aislado por él mismo de la enterotoxemia de la oveja" (")

Además comprobó mediante pruebas letales que en los filtrados de estos organismos existían por lo menos tres factores tóxicos: W, X, Z, que se relacionaban antigénicamente, como se indica a continuación:

Filtrado	Factor antigénico .-
Tipo A	W
Tipo B	W. X. Z.
Tipo C	W. Z.
Tipo D	W. X.

W es el factor antigénico presente en los filtrados de tipo A y

(") demostró luego que su tipo D y el "bacillus ovitoxicus" aislado por Bennetts era el mismo.-

en los de tipo B, C, D, de allí que las antitoxinas de estos últimos pueden neutralizar la toxina A, mientras que la antitoxina del tipo A sólo puede neutralizar su toxina.-

X: factor antigénico presente en los filtrados tipo B y D.-

Z: Factor antigénico presente en los filtrados tipo B y C.-

Estos factores fueron considerados por Wilsdon, no como entidades separadas, sino como cuerpos similares al antígeno bacteriano; así la toxina del tipo B era una simple especie molecular con grupos: W, X, Z.-

Basados en este trabajo, Glenny, Barr, Jewell-Jones, Dalling y Ross (1933) (10) mediante pruebas más seguras, usando antitoxinas puras y distintos indicadores, demostraron que el comportamiento antigénico de filtrados de *Cl. welchii* podía ser explicado en forma más completa, ya sea por la adición de dos nuevos factores (toxinas) o por otro camino, explicando la complejidad del factor Z de Wilsdon. Los autores mencionados anteriormente propusieron el esquema siguiente:

Filtrado	Toxinas
Tipo A	α $\alpha = W$
Tipo B	$\alpha, \beta, \delta, \delta, \epsilon$. $(\beta, \delta, \delta) = Z$
Tipo C	$\alpha, \beta, \delta, \delta$
Tipo D	α, ϵ . $\delta = X$

La descripción de estas toxinas de acuerdo a Glenny y colaboradores es la siguiente:

Toxina "alfa" α : producida por el clásico bacilo perfringens o *Cl. welchii*; está presente en el filtrado "agni" y en mayor

proporción en el "paludis"; la cantidad de toxina "alfa" en estos filtrados es 1/40 de la contenida en filtrados de *Cl. welchii* puros. Es neutralizada cuantitativamente por su antitoxina. Es necrótica, hemolítica, letal.-

Toxina "beta" β : Constituyente principal de los filtrados de *b. agni* y *b. paludis*. Neutralizada solamente por el suero de animales que han sido inmunizados con toxina paludis o bacilo disentérico; en menor extensión es neutralizada por el suero de caballos normales. Es necrótica, letal, pero no es hemolítica.-

Toxina "gamma" γ : Se encuentra en filtrados *agni*; el bac. paludis sólo la produce en muy pequeña cantidad, ya que, en muestras de suero de caballos, inoculados con filtrados paludis, la "gamma" antitoxina parece estar ausente. No es neutralizada por antitoxina α o β . Es letal para ratón.-

Toxina "delta" δ : No una hemolisina producida por el bacilo paludis; su presencia no ha sido claramente demostrada por Cleanny y colaboradores. Probablemente está presente en filtrados "agni" pues sueros de caballos inmunizados con "agni" protege la hemolisina del bac. paludis.-

Toxina "epsilon" ϵ (16) Los filtrados tipo B. y D la contienen como una toxina termoestable, letal y necrótica que tratada con tripsina se transforma en una toxina termolábil y mucho más tóxica. Sólo ciertos sueros de la disentería del cordero protegen contra filtrados tipo D de Wildon. Es letal y necrótica.-

La existencia de estas toxinas fué confirmada por titulaciones contra un cierto número de sueros, siguiendo técnicas diversas. Este método ha permitido comprobar que en algunos sueros falta uno o más anticuerpos específicos.-

La especie *Bacilo perfringens* o *Cl. welchii* está constituida por los biotipos mencionados, que se diferencian por la naturaleza de sus toxinas, por las enfermedades que producen y por su epidemiología.-

Uno de ellos tiene mucha importancia como agente de enfermedad humana, pues produce la gángerena cosecosa; se ha designado a este organismo como: *Bacilo perfringens* tipo A, *Cl. welchii* tipo A.-

En su trabajo, Glenny y colaboradores pusieron en evidencia el paralelismo de las propiedades: letales, hemolíticas y necróticas de la toxina del *Cl. welchii* tipo A, a la que denominaron "toxina alfa". Sin embargo Brigge (1936-37) (11) estudiando ciertos filtrados de *Cl. welchii* tipo A comprobó que la acción letal difería de la acción hemolítica, que por lo menos dos factores distintos existían en ese tipo de filtrados; a esos factores los denominó: "alfa toxina" o factor hemolítico y "zeta toxina" o factor letal.- (p)

La relación de ambas en distintos filtrados variaba entre límites muy amplios. Algunos de ellos tenían 1 dosis letal mínima (d.l.m.) y 500 dosis hemolíticas mínimas, (d.h.m.), en otros la relación era de 1 dosis letal mínima para 1/2 dosis hemolítica mínima.-

Pudo demostrar además que cantidades grandes de toxina alfa (100 "dha) no bastaban para determinar una intoxicación mortal en los animales de experiencia, en cambio filtrados con valor "alfa" muy pequeño (este valor se reducía por métodos adecuados) determinaban una intoxicación mortal aún en cantidades que sólo contenían 1/20, 1/50 de dosis hemolítica mínima.-

Es decir que la "toxina zeta" (p) es la causante de la acción especial del filtrado de *Cl. welchii* tipo A. Esto no excluye la posi-

bilidad de que las alteraciones de la sangre, producida por la "toxina alfa" pueda tener una mayor o menor importancia para el organismo intoxicado con la "zeta toxina".-

Tenemos entonces para la toxina producida por todas las cepas del *Cl. welchii* tipo A dos constituyentes principales: alfa y zeta toxinas. Sin embargo debe considerarse un tercer componente, encontrado hasta ahora en una sola cepa; se trata de la cepa Lechien de Weinberg; con ella trabajaron Ipsen y Davoli (1939) (12) encontrando este factor, al que denominaron "eta" (ζ).-

Ipsen, Mcwellyn, Smith y Sordelli (1939) (13) confirmaron la existencia de tales toxinas y usando la nomenclatura de Brigge afirmaron que en los filtrados de *Cl. welchii* tipo A podían presentarse estos factores en proporciones variadas:

- ξ : debilmente hemolítica, muy letal, necrótica.-
- α : muy hemolítica, poco letal, reacción hemorrágica en la piel de cobayo.-
- ζ : producida por cepa Lechien, sólo letal.-

La designación de estas toxinas condujo a confusiones, que por el momento se pueden considerar satisfactoriamente aclaradas. Un comité especialmente reunido en Cambridge en 1941, llegó a un acuerdo acerca de la nomenclatura de estos factores y es desde entonces que para los filtrados de *Cl. welchii* tipo A se reconocen los componentes antigénicos siguientes:

Factor I : Es letal para ratón, necrótico para la piel de cobayo, hemolítico para glóbulos rojos de oveja en presencia de iones calcio. Con suero humano y soluciones de huevo produce una opalescencia. Este factor corres-

ponde a la toxina alfa de Glenn y col. (10). Actualmente se la conoce como: "toxina alfa del Cl. welchii tipo A".-

Factor II ; Acción débil e irregular para la laucha por vía venosa; reacción hemorrágica y no necrótica por vía intradérmica en cobayos; hemoliza glóbulos rojos de oveja sin necesidad de iones calcio; es reversible por oxidación; no da reacción con huevo ni con suero; se neutraliza por la antiestreptolisina "O". Se la conoce como: "toxina theta"o" Theta hemolisina del Cl. welchii tipo A".-

Probablemente en 1926 Neill trabajaba con este "factor II" (5).-

La letra θ o theta, fué propuesta por Mac Farlane, Oackley y Anderson (1941) (14).-

Por error Prigge llamó "alfa" al factor II, error que fué repetido por Ipsen y colaboradores.-

En forma esquemática se representa en el cuadro I la nomenclatura de estos factores según los distintos autores:

--Cuadro I--

F.tóxico	Wilsdon	Glenny y col.	Prigge	Ipsen y col.	Dalling, Stephens Oakley
I	W	α (1933)	β (1936)	β (1939)	α (1942)
II	--	θ (1941)	α (1936)	α (")	θ (1942)
III	--	_____	_____	β (")	β [1943)

En este trabajo usaremos la nomenclatura indicada en la última columna. Las toxinas presentes en los cuatro tipos de filtrados y sus propiedades más importantes se pueden resumir en los cuadros II y III.-

Cuadro II (")

Toxinas presentes en los filtrados

Filtrado	α	β	δ	δ	ϵ	γ	θ
tipo A	+++	—	—	—	—	+	+
tipo B	+	+++	+	+	++	?	? +
tipo C	+	+++	+	++	—	?	? +
tipo D	+	—	—	—	+++	?	? +

Cuadro III (")

Propiedades de las toxinas

Propiedad	α	β	δ	δ	ϵ	γ	θ
Hemolítica	+	—	—	+	—	—	+++
Letal	+	+	+	+	+	+	+
Necrótica	+++	+	—	—	+	—	+
Lecitinasa	+	—	—	—	—	—	—
Acción del calor	estable	labil.	-----	-----	estable labil.	-----	labil.
Acción del O ₂	+	—	-----	-----	-----	-----	+++ reversible
Acción del calcio	+	-----	-----	-----	-----	-----	—

(") Estos cuadros fueron extraídos del artículo de C.L. Oackley publicado en el Bull of hygiene del 10-1943.- (15)

Capítulo II

OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO

El presente trabajo se inició en la observación realizada por Stewart y Clappitt (17) que, cuando el *Clostridium welchii* tipo A se siembra en caldo peptonado, adicionado de 10 % de carne molida y seca produce solamente la llamada toxina "alfa", que hemoliza glóbulos rojos de oveja al 5 % a 0°, luego de calentamiento previo a 37° durante media hora.-

Si en cambio se siembra en el mismo caldo pero sin carne, el filtrado contiene además toxina θ que actúa directamente sobre los glóbulos rojos al 5 %, a 37° durante media hora. Esta toxina se la conoce también como la θ hemolisina del *Cl. welchii*.-

Considerábamos de interés establecer que fracción de la carne o componente de la misma, produce la inactivación.-

El tratamiento de toxinas θ , por la carne, permite mostrar claramente la desaparición del poder hemolítico de los filtrados que la contenían.-

Esta inactivación es distinta de la que realizan ciertos agentes oxidantes, puesto que su actividad no se recupera por la acción de reductores fuertes, como sucede en la inactivación por oxidación.-

Los filtrados de *Cl. welchii* tipo A, contienen las toxinas alfa y theta θ . Se necesitaba para nuestros ensayos filtrados con alto contenido de toxina θ y practicamente sin valor alfa, es decir toxinas θ puras.-

Este fué el primer problema que se presentó; pero luego de numerosos ensayos se encontró el caldo y las condiciones adecuadas pa-

ra la preparación de Θ -hemolisina muy activa y sin toxina alfa. La solución a este problema permitió además estudiar la influencia de la alfa toxina en la inactivación de la Θ -hemolisina por la carne.-

Como resumen de estas experiencias puede desde ya anticiparse que el factor inactivante presente en la carne es el colesterol, lo que se confirma por ensayos realizados con colesterol puro.-

El bloqueo o la esterificación del grupo (HO-) alcohólico del colesterol impide la inactivación.-

Capítulo III

OBTENCION DE LA TOXINA O DEL GLOSTRIDIN WELCHII TIPO A

GENERALIDADES

Apesar de los numerosos trabajos conocidos, sobre la producción de toxina del Cl. welchii tipo A, recién en los de los últimos años se observan algunos intentos para la obtención de toxinas puras.-

Son conocidas las tentativas de Prigge para separar los dos factores tóxicos, presentes en los filtrados de Cl. welchii tipo A; utilizaba cepas seleccionadas y medios especiales, sin embargo no logró su intento.-

Se sabe que la naturaleza del medio de cultivo, influye sobre la constitución de las toxinas y por lo tanto sobre las propiedades del suero antitóxico. Esto fué comprobado por Stewart y Clappitt (16) (1938) al obtener "toxina alfa" libre de θ -hemolisina usando caldos peptonados con 10 % de carne molida y seca. Si en lugar de la carne se añade al caldo "corazón de buey" también se impide la formación de la θ -hemolisina y el filtrado sólo contiene "toxina alfa" (Bengston Ida) 1938. (17).-

Según Mac Farlane y Knight (18) la toxina alfa, es una lecitina-sa. Teniendo en cuenta ésto, Turner, Saly y Prowell (19) opinan que es posible aumentar la producción de esa toxina pasando por medios con lecitina. Después de una docena de pasajes por medio de cerebro la capacidad de producir toxina alfa está aumentada, pero se pierde la de producir toxina hemolítica θ .-

(20)Van Heyningen separa toxina alfa de toxina θ por absorción con glóbulos rojos de oveja, en condiciones bien determinadas; este mé

todo resulta sin embargo menos fácil y cómodo que el citado anteriormente.-

Es decir entonces que la preparación de "toxina alfa" pura, no presenta mayores dificultades, ya que son varios los métodos para tener filtrados alfa, muy activos y sin θ -hemolisina (ver trabajos de De Kruif, Bengston, Sordelli, Ferrari, Gimenez de Asúa, Stewart y Seal).-

El problema inverso, o sea la obtención de toxina θ pura, libre de alfa, es mucho más complejo. Probablemente investigadores como Neill, Wuth, Schnayerson y Samuels trabajaron con este factor hemolítico.-

La solución de este problema era de vital importancia para la continuación de nuestras experiencias. Felizmente se encontró luego de numerosos ensayos un método sencillo y rápido que nos permitió preparar toxinas θ , muy activa y con un contenido "alfa" casi nulo (21).-

Los trabajos de Stewart y otros investigadores han sido una ayuda valiosa en estas experiencias.-

En todo el trabajo se ha usado la cepa 107, conocida como 107 S, pasada repetidas veces por cobayos, en inyección intramuscular.-

La técnica de la preparación es la siguiente:

METODO DE CULTIVO: A una parte de carne desgrasada y molida se le agrega dos partes de agua corriente y se hierve durante 30 minutos; se filtra por papel mojado.-

Al agua de carne así preparada, se agrega 2 ‰ de fosfato disódico; 4 ‰ de cloruro de sodio; 2 ‰ de peptona Parke - Davis ;

se alcaliniza con NaOH hasta $\text{pH}=8,4$ (este caldo así preparado es designado "caldo básico").-

Se vierte sin filtrar en frascos erlenmeyer apropiados de acuerdo a la cantidad de caldo requerida, teniendo cuidado de que siempre haya un buen volumen libre, pues a veces la toxina produce gran cantidad de espuma (por ejemplo; para 600 cc. de caldo utilizar frascos de dos litros).-

Los frascos llevan un tapón de goma con un dispositivo para hacer circular hidrógeno y dos tubos que llegan al líquido, uno para alcalinización y el otro para la toma de muestras necesarias para regular el pH .-

Así preparado se esteriliza el medio a 115° durante 20 minutos y se saca del autoclave aún hirviendo.-

Se conecta con un aparato productor de hidrógeno, lavado con soda y permanganato (alcalino) y de modo que el aire no llegue a estar en contacto con el medio.-

Se agrega una solución de glucosa al 50 %^o, esteril, en cantidad suficiente para que el medio contenga 1 %^o de glucosa; se utiliza para este agregado el tubo que está menos hundido en el líquido.-

CULTIVO DE SINTOMA : Las cepas conservadas en agar o en Tarozzi pierden la capacidad de producir toxina θ muy activa (Turner, Ealy, Prodwell) (19) en cambio la conservan si se las guarda desecadas en vacío. Para ello se usa el método aplicado comúnmente en el Instituto Bacteriológico "Carlos Malbrán" para conservación de cepas.-

Cuando la bacteria ha disminuido su poder tóxico θ , se lo puede recuperar por pasajes por cobayos.- (alcanzaban a veces hasta

tres y seis pasajes). Parecería que alguno de los cultivos obtenidos fuera más toxígeno que otros.-

El cultivo para la siembra se prepara en tubos de Hall con 50cc. del mismo medio básico para producir la toxina; se utilizan cultivos frescos de 12 a 16 horas de incubación.-

PREPARACION : Se siembra el frasco de toxina una vez enfriado convenientemente, con el contenido de un tubo de Hall (50cc.) por el mismo tubo que se agregó la glucosa y se incuba a 37°; durante todo el tiempo del cultivo se hace pasar hidrógeno.-

El desarrollo es muy rápido y muy intenso, con producción de gran cantidad de gas; a medida que se desarrolla la alcalinidad se reduce y debe ser mantenida por adición de HONa esteril al 20 %/o. En general se agrega de 2 a 5 cc. de HONa por vez, los intervalos son de 10 a 15 minutos; el pH oscila de 7,4 a 7,8.-

La determinación del pH se hace sobre muestras, que se toman con una pipeta, por el tubo que está más introducido en el líquido; por el método colorimétrico (fenol red) usando tubos estériles y con las precauciones de asepsia necesarias para evitar la contaminación del medio.-

En general entre las 5 y 6 horas, la operación está terminada; se hace pasar hidrógeno por unos 15 minutos más; (30 a 60 burbujas por minuto); se cierra el tubo de escape con una pinza; se tapan los tubos de vidrio y se deja el frasco bajo presión de hidrógeno del aparato de Kipp, que permanece comunicado por el tubo de admisión.-

Así queda por unos a tres días a la temperatura del laboratorio (más o menos 20°); en cualquier momento se pueden tomar muestras teniendo la precaución de disminuir la presión de hidrógeno pues de otra manera se escaparía el líquido por el tubo de toma de muestra.-

La marcha del proceso puede seguirse más fácilmente mediante los protocolos siguientes:

Caldo básico: 3.600 cc.; glucosa (50 %) hasta 1 %; cultivo 107, seis pasajes cobayo, conservada en vacío.-

TIEMPO	GAS	pH	HORA 20 %	pH
15,20	++	7,6	3 cc	7,8
15,35	++	7,6	3 cc	7,8
15,50	++	7,6	- --	7,6
16,--	++	7,4	4 cc	7,8
16,15	+++	7,6	2	7,8
16,40	+++	7,4	7	8
16,50	+++	7,2	5	7,8
17,--	+++	7,4	4	7,6
17,10	+++	7,2	5	7,6
17,20	+++	7,2	5	7,6
17,30	+++	7,2	5	7,6
17,50	+++	7,4	6	7,8
18,--	++	7,4	4	7,8
18,25	++	7,2	6	7,6
18,40	++	7,2	7	7,6
18,50	++	7,2	6	7,6
19,10	++	7,4	3,5	7,8
19,10	++	7,2	7	7,8

La toxina formada al terminar la incubación a 37° está constituida por una mezcla de α y θ , sólo al cabo de 1 a 3 días, desaparece

la toxina α , mientras que la toxina θ disminuye poco o nada su actividad. En este momento se filtra por papilla y por filtro Seitz y se obtiene un filtrado muy tóxico de toxinas θ practicamente libre de toxina α .-

TIEMPO	GAS	pH	HONa 20 %	pH
16,20	++	8	----	---
16,35	++	7,6	----	---
16,45	++	7,8	----	---
17,--	+++	7,6 7,8	----	---
17,10	+++	7,6	----	---
17,25	+++	7,6	----	---
17,35	+++	7,4	2 cc	7,6
17,50	+++	7,4	2 cc	7,6
18,10	+++	7,4	2,5 cc	7,6
18,20	+++	7,4	2,5 cc	7,6
18,30	++	7,4	2 cc	7,6
18,45	++	7,4	3,5	7,6
18,55	++	7,6	----	---
19,30	+	7,4	2 cc	7,6
19,40	+	7,4	3 cc	7,6 7,8
19,50	+	7,4	3 cc	7,6
20,30	+	7,4	3 cc	7,8

Durante todo el trabajo se prepararon cantidades distintas de toxinas, los resultados y el comportamiento de la toxina siempre ha sido el mismo; salvo en contadas ocasiones el valor θ disminuyó,

cuando se dejaba en contacto con hidrógeno a la temperatura del laboratorio, pero en general sólo desaparecía el valor alfa, permaneciendo constante el de la toxina hemolítica θ .-

Cuando el pH no varía más, se suspende el agregado de álcali, después de 15 minutos se cierra el tubo de escape y los de adición de reactivos y toma de muestra, dejando bajo presión de hidrógeno a la toxina.-

Los valores de toxina θ y α desde las 19,10 hs. en que el desarrollo termina, hasta cuatro días después son los siguientes:

I

TIEMPO	VALOR	VALOR θ
	Lecitinasa	Hemólisis por 0,5 cc. Glóbulos rojos de oveja 5 %
1 día	0,0038 /	0,00016
2 días	0,015 /	0,00016
3 días	0,06 /	0,00016
4 días	0,5 /	0,00032

2) Caldo 1200 cc., glucosa hasta 1%, cultivo cepa 107, 6 pasajes, conservado en vacío, sembrar con contenido de tubo de Hall, de 18 horas.-

Los valores obtenidos, en este caso son los que figuran a continuación:

II

TIEMPO	VALOR α	VALOR θ
1 día	0,007	0,00008
2 "	0,06	0,00008
3 "	0,5	0,00008

El protocolo que corresponde a la toxina, cuyos valores figuran en el cuadro II son los que se encuentran en el protocolo de la página 17.-



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA θ DEL
CL. WELCHII

Control de las toxinas que la acompañan

a) PRUEBA DE LA TOXINA θ : La concentración de toxina θ se mide, por su acción hemolítica frente a una suspensión de glóbulos rojos de oveja al 5 % y a 37° durante media hora. Este método da valores suficientemente exactos para medir la toxina θ , aún en presencia de toxina alfa. En primer lugar porque la "alfa" toxina más activa que se ha preparado tiene un título hemolítico diez veces inferior, a los que se obtienen para buenos preparados de θ -hemolisina y en segundo lugar porque la hemólisis por la toxina "alfa" se produce manteniéndola a 0° media hora después de calentarla a 37°. Como ejemplo de medida de esta toxina θ puede verse el protocolo A que es típico de estas experiencias.-

PROTOCOLO A

<u>TUBO</u>	1	2	3	4	5	6	7	8
Toxina θ diluida en s.f.	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Glóbulos rojos (susp. 5% en s.f.)	a cada tubo 0,5 cc. de suspensión al 5 %. 1/2 h 37°							
Hemólisis	H	H	H	H	H	H	H	H

s. f.: soluc. fisiológica.-

Es corriente expresar que la toxina θ tiene una actividad hemolítica de 1/12800 ó 1/6400. Nuestros medios contenían habitualmente

θ-hemolisinas más activas en diluciones de 1/12.800 y 1/6.400, lo que significa que 0,00016 ó 0,00008 cc. del medio original bastan para hemolizar los glóbulos rojos de oveja al 5 %, a 37°.-

La dosis mínima que produce hemólisis total suele denominarse dosis hemolítica mínima; "d.h.m.".-

En el protocolo anterior: 1/100, 1/200 etc. significan las diluciones de la toxina y con "H" se expresa la hemólisis total, "C.H" casi hemólisis (esta notación se usará en los protocolos siguientes).-

b) MEDIDA DE TOXINA "alfa": La toxina alfa de un filtrado de *Ci. welchii* tipo A se puede titular por su acción hidrolizante sobre la lecitina de la yema de huevo, en presencia de iones calcio. Este ensayo se conoce como reacción de Nagler.-

Los ácidos grasos separados precipitan bajo forma de sal de calcio y dan una opalescencia que se observa fácilmente.-

Se emplea suspensión de una yema de huevo en 500 cc. de solución fisiológica, que tiene 0,5 ‰ de cloruro de calcio.-

Para tener suspensiones finas y homogéneas se filtran antes de su empleo por papilla y por Seitz.-

Como la toxina θ, no tiene actividad hidrolizante sobre la lecitina, esta reacción permite medir la cantidad de toxina alfa, presente en una toxina θ y aún establecer su ausencia.-

El protocolo B es típico de una de estas experiencias.-

PROTOCOLO B

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Toxina (diluída en s.f.)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
sol. huevo	a cada tubo 1 cc. de la suspensión indicada <i>1/2 h. 37°.</i>							
Opalescencia	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++

En este protocolo figuran: las diluciones de la toxina en la segunda línea 1/2, 1/4, etc.; la cantidad de solución de huevo añadida en la tercera, y el número de cruces, en la 4ª línea indica la intensidad de la opalescencia producida.-

El último tubo que presenta opalescencia señala el límite; la cantidad de toxina que contiene el mismo, se considera como: "dosis límite de actividad lecitinasas". Para establecer esta dosis se comparan los tubos de la serie con un tubo testigo que contiene 0,5 cc. de solución fisiológica y 1 cc. de suspensión de huevo.-

En nuestras toxinas el tubo límite suele encontrarse entre 0,007 y 0,0038 cc. es decir entre las diluciones del 7º y 8º tubo.-

c) PODER TOXICO: Esta determinación se realiza por inoculación endovenosa de la toxina Θ filtrada, a ratón blanco (15g.). Se trata de establecer la dosis mínima que produce la muerte del animal en 24 horas.-

En los ensayos realizados por nosotros la "dosis letal mínima" se encontraba entre 0,02 y 0,005 cc. del filtrado original.-

d) PODER NECROTICO : Se determina por inoculación intradérmica de la toxina Θ filtrada a cobayos.-

Se trata de establecer la dosis mínima de toxina Θ , capaz de producir lesiones necróticas de 5mm x 5mm en la piel del cobayo. A esta dosis se la denomina "dosis necrótica mínima" (d.n.m.).-

En nuestras toxinas esa dosis se encontraba entre 0,04 y 0,01 cc del filtrado original.-

Es interesante señalar que la relación entre la d.l.m. / d.h.m. es aproximadamente igual a 100, esto no tiene otro significado que el indicarnos que ambas actividades guardan una relación constante.-

Capítulo IVESTUDIO DE LA ACCION DE LA CARNE, SUS EXTRACTOSY DISTINTAS FRACCIONES

Para llegar a la conclusión que el colesterol era la substancia contenida en la carne que inactivaba la toxina θ , producida por el *Cl. welchii*, tipo A en las condiciones que se han señalado fué necesario fraccionar la misma, de acuerdo a los métodos clásicos.-

En todos los casos se utilizó un preparado conteniendo toxina θ capaz de dar hemólisis total, en diluciones no menores de 1/3200, habitualmente mucho mayores.-

Un volumen de este preparado (5 cc) se mezclaban con 1 g. de carne o una fracción obtenida de la misma, equivalente a esa cantidad y se incubaba a 37° durante una hora. Al cabo de ese tiempo se titulaba la actividad hemolítica, comparándola con la de la toxina original, sometida a la misma incubación pero sin carne. La diferencia entre ambos valores daba una medida de la inactivación.-

La acción inactivante de la carne sobre la toxina θ , se realiza tanto sobre un cultivo de 48 horas conteniendo los gérmenes que en él se desarrollan, (llamado " θ - cultivo") como sobre ese cultivo centrifugado a 2000 r.m. lo que elimina la mayor parte de los gérmenes (llamado toxina " θ - centrifugada") o sobre toxina contenida en un filtrado por Seitz del cultivo primitivo (llamado toxina " θ filtrada"). -

Se determinó simultáneamente la cantidad de toxina alfa contenida en los preparados anteriores.-

I). ACCION DE LA CARNE SOBRE TOXINA Θ DE VAL. CL. MICHII TIPO A

Los primeros ensayos efectuados con carne total demostraron que en determinadas condiciones, era necesaria una cierta cantidad de toxina alfa en el medio para que pudiera producirse la inactivación de toxina Θ. Los protocolos I y II muestran perfectamente esta influencia.-

Cuando alfa toxina está presente, pero en muy pequeña concentración, la Θ-toxina no se inactiva, cualquiera que sea el tratamiento anterior (protocolo I).-

A medida que la concentración de toxina alfa en el filtrado va aumentando, la inactivación se hace más intensa, (protocolo II).

Esta acción de la toxina alfa se confirmó, empleando toxina Θ, 1/100 de ella y a la cual se añadió una cantidad de toxina alfa. Una experiencia de esta clase es la que se describe en el protocolo III. La toxina Θ de valor o título hemolítico 1/3200 lo mantiene a pesar de incubarse a 37° durante una hora, pero en cambio por añ dido de 2,5 cc de toxina alfa de valor lecitinasa igual a 0,0030, disminuye a 1/1600 cuando la mezcla con carne se mantiene en contacto 10 minutos y dejándola durante 1 hora el valor hemolítico ba ja a 1/100, es decir se atenua 32 veces. Esto sucede tanto con un cultivo de toxina Θ que se ha filtrado por Seitz como para ese cul tivo, pero centrifugado.-

PROTOCOLO I

Toxina Θ	Valor alfa	Tratada con:	título inicial	título final	Atenuac.
cultivo dir.	0,5	lg. carne 1h37"	1/12800 H	1/12800 H	0
centrifug.	0,5	" " "	1/12800 H	1/12800 H	0
filtrada	0,5	" " "	1/12800 H	1/12800 H	0

PROTOCOLO II

TOXINA θ	VALOR alfa	Tratada con:	Título inicial	Título final	atenuac.
θ filtrada	0,015 /	lg. carne, 1h 37°	1/3200 H	1/400 H	8
		sin carne 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
θ filtrada	0,25 /	lg. carne 1h 37°	1/3200 H	1/1600 H	2
		s/ carne 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
θ filtrada	0,5 /	lg. carne 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
		s/ carne 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0

Protocolo III

Toxina θ filtrada	Valor alfa	Tratada con:	Título inicial	Título final	Atenuación
5 cc	0,5 /	1h.a 37° sin carne.	1/3200 H	1/3200 H	0
5 cc	0,5 /	1h.a 37° con lg. carne.	1/3200 H	1/3200 H	0
2,5 cc	0,5 /	10'a 37° con 2,5 cc tox. alfa y lg carne.	1/3200 H	1/1600 H	2
2,5 cc	0,5 -/	1h a 37° con 2,5 cc. toxina alfa y lg. carne.	1/3200 H	1/100 H	32

La toxina ensayada en la experiencia del protocolo III no da reacción de lecitinasa, lo que permite considerarla prácticamente libre de toxina alfa. Los ensayos realizados para confirmar esto, muestra que 0,5 cc del filtrado que contiene la θ -hemolisina no produce opalescencia con 1 cc de la solución de yema de huevo.-

Esta toxina θ , pura, libre de toxina alfa fué preparada siguiendo el método indicado en la página ¹⁴ de este trabajo.-

2. FRACCIONAMIENTO DE LA CARNE Y ENSAYO DE LAS DISTINTAS

FRACCIONES SOBRE LA TOXINA 9

a) Extracción de la carne por alcohol absoluto: El primer fraccionamiento que se hizo de la carne seca (carne molida, extraída previamente por ebullición y secada rápidamente) fué obtener un extracto alcohólico de la misma. La carne es sometida al tratamiento siguiente:

Una cantidad conocida de carne seca se extrae varias veces con un volumen adecuado de alcohol hirviendo, los extractos alcohólicos reunidos se evaporan y suspenden en solución fisiológica.-

Los ensayos realizados con; extracto alcohólico y carne extraída demostraron claramente que el factor inactivante era extraído por el alcohol.-

En todos los casos se usó una proporción de extracto alcohólico equivalente al gramo de carne habitualmente empleado para 5 cc de toxina. (Protocolos IV y V)

PROCOLO IV -

TOXINA 9 filtrada	Valor alfa	toxina agreg.	Tratada con	Título inicial	Título final	Aten
5 cc	0,5 /	-----	lg. carne lh 37°.....	1/6400H	1/6400H	0
2,5 cc	0,5 /	2,5cc	lg. carne lh 37°.....	1/6400H	1/100 H	64
5 cc	0,5 /	-----	lg.resid.alcoh. lh 37°.	1/6400H	1/6400H	0
2,5 cc	0,5 /	2,5cc	lg.resid.alcoh. lh 37°.	1/6400H	1/6400H	0
5 cc	0,5 /	-----	(lg)extrac.alcoh.lh 37°	1/6400H	1/6400H	0
2,5 cc	0,5 /	2,5cc	(lg)extrac.alcoh.lh 37°	1/6400H	1/100 H	64

En el protocolo IV la primera experiencia confirma la inactivación de la toxina Θ por la carne en presencia de la toxina alfa.

La segunda experiencia muestra que el extracto alcohólico contiene todo el poder inactivante, lo cual está confirmado por que el residuo ha perdido totalmente ese poder.-

La influencia de la toxina alfa que la señalaría como un factor necesario en la inactivación de toxina Θ por carne y por extracto alcohólico de la misma, desaparece para esta última fracción si se mantiene toxina Θ , por lo menos 4 horas a -78° . (Protocolo V).-

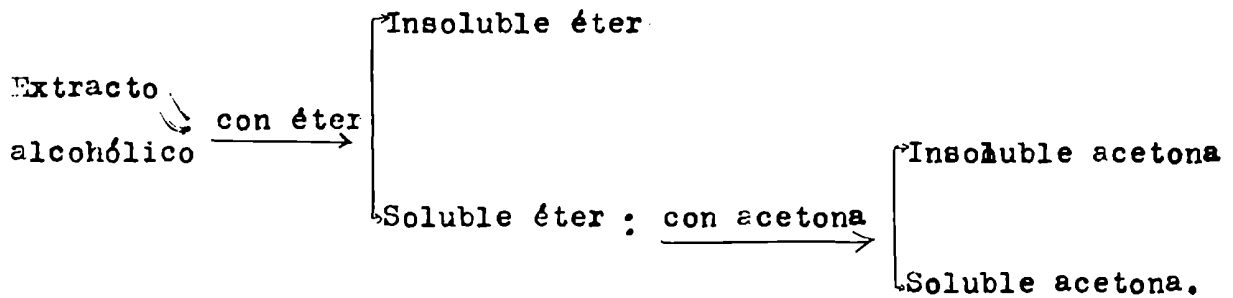
Para estas experiencias con toxina congelada se ha utilizado tan sólo toxina filtrada y para diferenciarla de la que no ha sido sometida a este tratamiento la denominaremos "toxina filtrada congelada" (2 Θ cc. ").-

PROTOSCOLO V

Toxina Θ f. cc	Valor alfa	Toxina α agregada	Tratada con:	Título inicial	Título final	Aten.
5 cc	0,5%	-----	1g. resid. alcoh. 1h 37°	1/6400 H	1/6400 H	0
2,5 cc	0,5%	2,5 cc	1g. resid. alcoh. 1h 37°	1/6400 H	1/6400 H	0
5 cc	25%	-----	(1g) extrao. alcoh. 1h 37°	1/6400 H	1/ 100 H	64
2,5 cc	0,5%	2,5 cc	(1g) extrao. alcoh. 1h 37°	1/6400 H	1/ 100 H	64

Teniendo en cuenta que la fracción inactivante de la carne era extraída por el alcohol, se fraccionó dicho extracto por tratamiento con distintos disolventes orgánicos. El extracto alcohólico tratóse con eter etílico teniendo así la fracción soluble e insoluble en eter; tratando la parte soluble en eter con acetona, queda una fracción soluble y otra insoluble en ese solvente (ver el esquema si-

guiente).-



Los resultados de las experiencias con estas fracciones figuran en el protocolo VI.-

PROTOCOLO VI

Toxina e filt	Valor alfa	Toxα agreg.	Tratada con:	Título inicial	Título final	Atenua.
1) 5 cc	0,5 -	----	Extracto alcoh. 1h 37°	1/6400 H	1/6400H	0
2) 5 cc	" -	----	Soluble en éter 1h 37°	1/6400 H	1/100 H	64
3) 5 cc	" -	----	Insol. en éter 1h 37°	1/6400 H	1/6400H	0
4) 5 cc	" -	----	Solub. en acetona 1h 37°	1/6400 H	1/100 H	64
5) 5 cc	" -	----	Insol. en acetona 1h 37°	1/6400 H	1/6400H	0

La primera experiencia confirma que la inactivación de toxina e fresca, por los lípidos contenidos en el extracto alcohólico no se realiza en ausencia de alfa, mientras que para la congelada (1'), Protocolo VII, la inactivación se produce en ausencia de toxina alfa. Las experiencias 2 y 4 muestran que las fracciones: soluble en éter y soluble en acetona tienen poder inactivante sobre la toxina e fresca aún en ausencia de alfa, como así también sobre la toxina e cg. (2' y 4', protocolo VII).-

PROCOLO VII

TOXINA Θ filt.cg.	Valor alfa	Tox α agreg.	Tratada con:	Título inicial	Título final	Aten
1' 5 cc	0,5	---	Extrac.alcohól. 1h37°	1/6400 H	1/100 H	64
2' 5 cc	"	---	Soluble en éter 1h37°	1/6400 H	1/100 H	64
3' 5 cc	"	---	Insol. en éter 1h37°	1/6400 H	1/6400 H	0
4' 5 cc	"	---	Sol.en acetona 1h37°	1/6400 H	1/100 H	64
5' 5 cc	"	---	Insol. acetona 1h37°	1/6400 H	1/6400 H	0

Las experiencias 3 y 5, 3' y 5' de los protocolos VI y VII muestran la poca acción inactivante de las fracciones insolubles en éter y acetona.-

Se observó al ensayar estas fracciones más purificadas que las mismas atenuaban la toxina Θ tanto en ausencia, como en presencia de toxina alfa, y esto ocurría tanto para la toxina congelada a -78° como para la que no se había sometido a la congelación. Es decir que todo se comportaba como si a medida que aumentaba la purificación de los lípidos estos adquirían una acción inactivante más directa sobre la toxina Θ no congelada, que no requería la condición hasta entonces necesaria para la inactivación como lo era en la presencia de toxina alfa.-

2.- b) EXTRACCION DE LA CARNE POR ACETONA .-

A los efectos de tener mayor material se procedió a tratar la carne con acetona, puesto que el extracto cetónico contiene sustancias que poseen mayor actividad. El extracto cetónico se preparó

en la siguiente forma;

Una cantidad conocida de carne se trata con acetona, se deja 24 horas en contacto tratando de agitar el mayor tiempo posible, se evapora y suspende en solución fisiológica. La suspensión que se prepara contiene una cantidad conocida de sustancias extraídas por cc. Esto permite poder comparar los resultados de los ensayos con las distintas fracciones. En el protocolo VIII, se puede observar la inactivación producida por el extracto y la carencia de acción en este sentido por la carne extraída. Los resultados con distintas partidas de toxina Θ congelada o sin congelar permiten confirmar los obtenidos anteriormente.

PROTOCOLO VIII

Toxina Θ congelada	Suspens. cc.	Extracto alcohól.	Tratados con	Título inicial	Título final	Aten
Θ preparada el 9-X-43	2cc	0,24 g	5 cc tox. Θ cg. 1h 37°	1/3200 H	1/100 H	32
	1cc	0,12 g	" " " "	1/3200 H	1/100 H	32
	0,5cc	0,06 g	" " " "	1/3200 H	1/100 H	32
	0,25cc	0,03 g	" " " "	1/3200 H	1/100 H	32
	0,125	0,015g	" " " "	1/3200 H	1/100 H	32
Θ preparada el 22-X-43	idem	idem	idem	1/6400 H	1/100 H	64
Θ preparada el 2-XI-43	idem	idem	idem	1/3200 H	1/100 H	32
Θ toxina	----	residue cetónico	5 cc Θ cg.	1/3200 H	1/3200H	0

Las mismas experiencias con Θ filtrada sin congelar dieron los mismos resultados.-

2.- c) EXTRACCION DE LA CARNE POR EL ÉTER DE PETRÓLEO :

Esta acción intensa del extracto cetónico hizo sospechar que ella se debía a las grasas o al colesterol libre o esterificado, lo cual se hizo más verosímil cuando se observó que un extracto de éter de petróleo de la carne total contenía sustancias de alto poder inactivante, cuando se trataba la θ -hemolisina. (protoc. IX).-

PROTOCOLO IX

Toxina	Tratada con	Suspensión	Extracto éter pet.	Título inicial	Título final	Aten.
θ fil. cg.	Extracto éter de petróleo	2cc	0,3 g.	1/12800 H	1/100 H	128
		1cc	0,15g.	1/12800 H	1/100 H	128
		0,5cc	0,075g.	1/12800 H	1/100 H	128
		0,25cc	0,0030g.	1/12800 H	1/100 H	128
θ filt. cg.	Residuo éter de petróleo	-----	1 g.	1/12800 H	1/12800 H	0
		-----	0,5 g.	1/12800 H	1/12800 H	0
θ filt. fresca	Extracto éter de petróleo	2cc	0,2 g.	1/3200 H	1/100 H	32
		1cc	0,1 g.	1/3200 H	1/100 H	32
		0,5cc	0,05g.	1/3200 H	1/100 H	32
		0,25cc	0,025g	1/3200 H	1/100 H	32
θ filt. cg.	Residuo éter de petróleo	-----	1 g.	1/3200 H	1/3200 H	0
		-----	0,5 g.	1/3200 H	1/3200 H	0

Para diferenciar entre la acción del colesterol y de las grasas, se saponificó la fracción soluble en éter de petróleo por los métodos clásicos.-

El ensayo de las fracciones obtenidas demuestra sin lugar a dudas, que el principio inactivante se encontraba en la fracción in-

saponificable.-

SAPONIFICACION DEL EXTRACTO ÉTER D. PETRÓLEO

Se trata una cantidad conocida de carne, con éter de petróleo (varias extracciones) se filtra en caliente y queda así: un extracto (a) y un residuo (b).-

El extracto (a) se trata con potasa alcohólica al 0,1 N. se agita fuertemente y los ácidos grasos pasan por este tratamiento al estado de jabón potásico, mientras que el insaponificable queda disuelto en el éter de petróleo. Este se decanta en un balón y la solución de jabones potásicos se extrae por dos veces con éter de petróleo. Las soluciones etéreas se reúnen con la primera, se evaporan y el residuo se suspende en solución fisiológica, tenemos así el "insaponificable" (c).

El residuo (b) se trata por alcohol hirviente y se obtiene de esta manera un extracto alcohólico (d) y un residuo alcohólico (e). La solución de jabones potásicos se diluye con agua, se acidifica con HCl puro y se extrae por tres veces consecutivas con éter de petróleo, se filtra, evapora y suspende en solución fisiológica "ácidos grasos" (f). Protocolo X.

PROTOCOLO X

Toxina	Tratada con:	Tít. inic.	Tít. final	Aten.
1. 0 f.f	0,1g lípidos totales 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
2. 0 f.f	0,1g extrac.éter petr.1h 37°	1/3200 H	1/100 H	32
3. 0 f.f	0,1g extracto cetónico 1h 37°	1/3200 H	1/100 H	32
4. 0 f.f	0,2g ácidos grasos 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
5. 0 f.f	0,2g insaponificable 1h 37°	1/3200 H	1/100 H	32
6. 0 f.f	0,05g extracto alcohólico 1h 37°	1/3200 H	1/3200 H	0
7. 0 f.f	Extracto alcoh.(d) y extrac. éter de petróleo (a) 1h 37°	1/3200 H	1/100 H	32

continúa Protoc. X

Continúa Protocolo N.º 1

Toxina	Tratada con:	Título inicial	Título final	Atonuec.
1º a feg.	0,1g lípidos totales 1h37º	1/3200 H	1/100 H	32
2º a feg.	0,1g extrac.éter petr1h37º	1/3200 H	1/100 H	32
3º a feg.	0,2g extrac.cetónico 1h37º	1/3200 H	1/100 H	32
4º a feg.	0,2g ácidos grasos 1h37º	1/3200 H	1/3200 H	0
5º a feg.	0,2g insaponificable 1h37º	1/3200 H	1/100 H	32
6º a feg.	0,05g extrac.alcoh.(a)1h37º	1/3200 H	1/3200 H	0
7º a feg	extrac.alcoh.(a) y extrac.éter petróleo (a) 1h37º	1/3200 H	1/100 H	32

La circunstancia conocida de que esa fracción (a) es altamente ri en colesterol nos indujo a ensayar su acción frente a la toxina e con el resultado que ya hemos enunciado al describir las experiencias, que poseía una acción inactivante.-

CAPITULO V

ACCION DEL COLESTEROL PURO Y DE SU ACETATO SOBRE LA TOXINA θ DEL
CL. WELCHII TIPO A

El tratamiento directo de la toxina θ con el colesterol permite confirmar su acción de inactivación sobre la misma. Tratada una hora a 37° con una suspensión de colesterol en solución fisiológica, pierde su actividad hemolítica. Esto se produce tanto con la toxina recién filtrada como con la toxina filtrada pero conservada congelada a -78° aún en ausencia de toxina alfa (protoc. XI).-

La toxina incubada a 37° sin colesterol, no modifica su actividad hemolítica. Por otra parte el colesterol no produce hemólisis de glóbulos rojos de oveja al 5% y a 37°.-

PROTOCOLO XI

Suspensión colesterol	Tratada con:	Título inicial	Título final	Aten.
2cc (0,1g)	5 cc tox. θ f.f, 1h 37°	1/12800 H	1/100	128
1cc (0,05g)	"	1/12800 H	1/100	128
0,5cc (0,025g)	"	1/12800 H	1/100	128
0,25cc(0,012g)	"	1/12800	1/100	128
2 cc	5 cc tox. θ f.cg. 1h 37°	1/3200 H	1/100	32
1 cc	"	1/3200 H	1/100	32
0,5 cc	"	1/3200 H	1/100	32
0,25cc	"	1/3200 H	1/100	32

Los ensayos se realizan con toxina congelada a -78° (f.cg.) y

sin congelar (f.f).

El comportamiento del colesterol en ambos casos es el mismo. La suspensión de colesterol utilizada en los ensayos se prepara en la forma siguiente; una cantidad conocida de colesterol se disuelve en alcohol o acetona, evaporando y suspendiendo el residuo en solución fisiológica.-

Conocida la acción del colesterol se intentó determinar la naturaleza de esa acción.-

El ensayo con acetato de colesterol, muestra que la esterificación del colesterol impide la inactivación de la toxina θ del Cl. welchii, tipo A. Para llegar a esto se realizaron las experiencias siguientes:

Se preparan soluciones alcohólicas de acetato de colesterol y colesterol, se evaporan ambas y suspenden en solución fisiológica (es conveniente conocer la cantidad de substancia por cc. para poder comparar los resultados).-

Estas suspensiones se mezclan con 5 cc. de toxina filtrada y se incuban a 37° durante una hora. Además la toxina sin colesterol y sin acetato se lleva también a la misma incubación durante una hora. Al cabo de ese tiempo se titula la toxina y se compara con el valor original (protocolo XII).-

El acetato de colesterol se preparó en la siguiente forma

Se calienta una solución de 5 g. de colesterol en 7,5 cc. de anhídrido acético, enfriar, filtrar y lavar el producto con alcohol metílico.-

PROCOLO XII

Suspensión	Contenido de colest.	Tratada con:	Título inicial	Título final	Aten.
2cc colesteroi	(0,05g)	5cc tox.θ f.f 1h37°	1/3200 H	1/100 H	32
2cc acetatocol.	(0,05)	5cc tox. θf.f 1h37°	1/3200 H	1/3200 H	0
2cc colesteroi	(0,05g)	5cc tox.θ fcg.1h37°	1/3200 H	1/100 H	32
2cc acetatocol.	(0,05g)	5cc tox.θ fcg.1h37°	1/3200 H	1/3200 H	0

CAPITULO VIACCION DE AGENTES REDUCTORES SOBRE LA TOXINA θ INACTIVADA POR
CARNE Y POR COLESTEROL

Es conocido el hecho que la toxina θ hemolítica del *Cl. welchii* cuando se inactiva por oxidación, recupera su actividad por agentes reductores fuertes. En nuestros ensayos se ha utilizado una solución de $S_2O_4Na_2$ al 10%.-

La inactivación de la misma toxina por el colesterol, por la carne o extracto de lípidos que lo contengan es de un carácter diferente a los anteriores, pues no se produce la reactivación por los reductores. (protocolo XIII)

PROTOCOLO XIII

<u>TOXINA</u>	<u>TITULO HEMOLIT.</u>
1. Toxina filtrada original.....	1/12800 H
2. Toxina filtrada, por oxidación.....	1/100 H
3. Toxina filt. oxidada tratada por soluc. de $S_2O_4Na_2$ al 10 % durante 20' a 37°.....	1/6400 H
4a. Toxina filtrada, tratada por carne 1h a 37°.....	1/100 H
4b. Toxina filtrada, inactivada por carne, tratada con soluc. de $S_2O_4Na_2$ 10 % durante 20' a 37°.....	1/100 H
5a. Toxina filtrada, tratada por colesterol 1h a 37°.....	1/100 H
5b. Toxina inactivada por colesterol, tratada con solución de $S_2O_4Na_2$ 10 % durante 20' a 37°.....	1/100 H

En el protocolo anterior, se puede observar que la toxina θ del

Cl. welchii de valor hemolítico inicial 1/12800 H, lo pierde por oxidación (experiencia 2).-

Si esta toxina oxidada se trata por reductores fuertes como el $S_2O_4Na_2$ (un cc. de toxina para 0,1 cc solución de $S_2O_4Na_2$ al 10%) y vuelve a titularse, el poder hemolítico se recupera casi totalmente (experiencia 3).-

Este tratamiento aplicado a la toxina inactivada por la carne o por el colesterol, no permite recuperar el poder hemolítico, como puede observarse en las experiencias 4a, 4b, 5a, y 5b.-

CAPITULO VIISOBRE EL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA TOXINA ALFA Y LIPIDOS
EN LA INACTIVACION POR LA CARNE, DE TOXINA θ FRESCA

La circunstancia de que toxina θ fresca sólo puede inactivarse por la carne o extractos brutos de lípidos de la misma, en presencia de toxina alfa, nos indujo a realizar las experiencias señaladas en el protocolo que sigue, que permite por lo menos vislumbrar en principio, el mecanismo de acción.

PROTOCOLO XIV

Toxina θ		Título inicial	Título final	Aten.
1. θ f.f	Suspensión de lípidos 1h 37°	1/6400 H	1/6400 H	0
2. θ f.f	(Susp. de lípidos más alfa) 1h 37° se mezcla con la tox. θ 1h 37°	1/6400 H	1/100 H	64
3. θ f.f	(Lípidos más alfa 1h 37° y luego 5' a 100° mezcl. con tox. 1h 37°	1/6400 H	1/100 H	64
4. θ f.f	(Lípidos más alfa, calentada a 100° 5') 1h 37°, mezclar con toxina 1h 37°.....	1/6400 H	1/1600 H	4
1' θ f.cg	Lípidos 1h 37°	1/12800 H	1/100 H	128
2' θ f.cg	ídem exp. 2	1/12800 H	1/100 H	128
3' θ f.cg	ídem exp. 3	1/12800 H	1/100 H	128
4' θ f.cg	ídem exp. 4	1/12800 H	1/100 H	128

Los resultados obtenidos señalan que la toxina alfa, actúa sobre los lípidos produciendo una substancia inactivante, puesto que los lípidos sólo no activan la toxina fresca; en tanto que los lípidos

tratados por la alfa toxina, inactivada por calentamiento, producen una inactivación equivalente a cuando se los trata con toxina fresca.-

Compárese las experiencias 3 con la 4. Para la toxina θ congelada que carece de toxina alfa, por razones que no pueden explicarse por el momento, no es necesaria esa acción de toxina alfa sobre los lípidos. (Experiencia: 1', 2', 3', 4').-

CAPITULO VIII

SUSTITUCION DE LA CARNE POR EL COLESTEROL EN LA

PREPARACION DE LA TOXINA ALFA

PURA

Como decimos al principio, el empleo de un caldo peptonado, adicionado de una cierta cantidad de carne puede producir toxina alfa pura del Cl. welchii tipo A. Este método fué preconizado por Stewart y Clappitt (17).-

El haber encontrado que esa acción inactivante se debe al colesterol presente llevó a realizar algunas experiencias para ver si podía sustituirse la carne por el colesterol puro. Los ensayos realizados demuestran la posibilidad de hacerlo. Protocolo XV/.

PROTOCOLO XV

Caldo utilizado para la preparación de tox. alfa	Conservadas a 60	
	Valor alfa	Valor 0
1. Caldo con carne	0,0019 -	1/200 H
2. Caldo con colesterol	0,007 -	1/200 0
3. Caldo con lecitina	0,25 -	1/200 0
4. Caldo con colesterol y lecitina	0,25 -	1/200 0
5. Caldo común sin ningún agregado	0,0038 -	1/1600 H

Los caldos se prepararon en la siguiente forma:

Se preparan soluciones alcohólicas de 0,6g colesterol; 0,6 g lecitina y 0,6 g colesterol más 0,6 g de lecitina.

A cada una de estas soluciones se agrega 10 cc. de agua esteri-

lisada, hervir 2 minutos. Cada una de estas suspensiones se agregan a los frascos que contienen 200 cc del medio de cultivo; esterilizar a 115° durante 20', enfriar a 37° y añadir a cada frasco 20 cc de CO₂ hasta 10 %, glucosa hasta 1 % y sembrar.-

El cultivo para la siembra se prepara en tubos de Hall con 50 cc del medio básico para producir la toxina; esterilizando de la misma manera y sin glucosa. Cultivos de 12-16 horas. Cepa 107 (pasada varias veces por cobayo vía intramuscular).-

CONSIDERACIONES GENERALES

La inactivación de una toxina hemolítico por el colesterol ha sido establecida ya para el caso de la hemolisina oxígeno-lábil del estreptococo por Hewitt y Todd (22).-

Estos autores encontraron que la llamada estreptolisina O, del estreptococo hemolítico pierde no sólo el poder hemolitizante sino el letal por la acción del colesterol.-

Llegaron a demostrar que esta sustancia en ciertas condiciones protege a las lauchas contra la administración de esa toxina.-

La mencionada estreptolisina O está antigénicamente (23) vinculada como lo demostró E.W. Todd con la O-hemolisina del Cl. welchii tipo A ; teniendo ambas además el caracter común de inactivarse por los agentes oxidantes.-

Los resultados obtenidos por nosotros que la toxina O hemolítica del Cl. welchii tipo A es inactivada por el colesterol confirma la vinculación que existe entre la naturaleza de esas toxinas.-

Sería interesante comprobar si la toxina del tétano vinculada con la del neumococo y la del welchii es capaz de sufrir una inactivación similar por el colesterol.-

Debe sumarse a estos resultados la comprobación que el grupo alcoholico del colesterol parece necesario para la acción inactivante, puesto que la misma desaparece por acetilación del mismo.-

1. La inactivación de toxina θ del Cl. welchii tipo A por la acción de la carne se debe al colesterol presente en la misma.-
2. Para que esta acción inactivante tenga lugar, en el caso de la carne o de extractos alcohólicos, es necesaria la presencia de tox. α
3. En el caso de toxina θ cong. a -78° por un tiempo no menor de 4 hs, la acción inactivante se realiza aún en ausencia de tox. alfa.
4. Llegada una cierta etapa de purificación, de la fracción de lípidos que tienen acción inactivante o empleando colesterol puro tampoco es necesaria la presencia de toxina alfa.-
5. En los casos en que la toxina alfa es necesaria puede demostrarse que ésta actúa sobre los lípidos, los cuales adquieren así poder inactivante.-
6. Para obtener filtrados de Cl. welchii tipo A conteniendo tan sólo toxina alfa pura, puede sustituirse la carne por el colesterol puro.-
7. La toxina θ del Cl. welchii tipo A inactivada por el colesterol no se reactiva por acción de los agentes reductores.-

Corina E. de la Cruz

I N D I C E

FOFBA

Capítulo I : Antecedentes, definición y propiedades de la toxina θ , del Clostridium Welchii tipo A.-

Capítulo II : Objeto del presente estudio.-

Capítulo III : Obtención de la toxina θ . Método de preparación. Medida de la actividad de la toxina.-

Capítulo IV : Estudio de la acción de la carne, sus extractos y distintas fracciones, sobre la toxina θ . Influencia de la toxina "alfa" del Cl. welchii tipo A.-

Capítulo V : Acción de agentes reductores sobre la toxina θ inactivada por carne y por colesterol.-

Capítulo VI : Posible mecanismo de acción de la toxina "alfa" y lípidos en la inactivación de toxina " θ " por la carne.-

Capítulo VII : Sustitución de la carne por el colesterol en la preparación de toxinas "alfa" puras.-

Capítulo VIII : Consideraciones generales.-

Capítulo IX : Resumen.-

B I B L I O G R A F I A

1. Bull y Pritchett; (1940) Public Health Report. 55-753.-
2. De Kruif, Adams, Ireland P. O. N. B. A.
3. A. Ouranoff; (1917) Comp.Rend.Soc.Biológ. 80-706.-
4. Weinberg y Nasta; (1920) Ann.Instituto Pasteur. 34-690.-
5. Neill,J; (1926) The Journal of Exp. Med. 44-215.-
6. M. Weinberg y J. Barotte; (1929) Comp.Rend.Soc.Biol. 100-733.-
7. A.F.Schnayerson y S.L.Samuels;(1930) Journal Immunology.18-141.-
8. Dalling, Mac Ewen, Bennetts;(1940) Public Health Report (wash)
55-753.-
- 9) Wilsdon; (1943) Bull of Hig. 18.-
- 10.Glenny A.T; Barr Kollie;Llewellyn Jones M; Dalling T; Ross Helen;
The Journal of Path.and Bact. 37-53,74.- (1933).-
- 11.Prigge R; Zitschift J. Immuntasfors (89-477,483-1936)
" " " (91-457,469-1937).-
- 12.Ipsen y Dávoli;(1939) Bull. League Nat, Health. Organ. 8-833
- 13.Ipsen J; Llewellyn Smith M, Sordelli A;(1939) Bull. League Nat.
Health. Organ 8-797.-
- 14.Mac Farlane R.G; Oakley C.L; AndersonC.G; (1941) J. Path. Bact.
52-99.-
- 15.Oakley C.L;(1943) Bull of Hyg. 18-781.-
- 16.Stewart y Clampitt;(1938).-
- 17.Bengston Ida;(1938); Bull League Nat, Health Organ. 7-802
18. Mac Farlane y Knight; Nature 150-549-1942.-
- 19.Turner A.W; Ealy C; Prodwell A.W.(1942) 150-549; 149-56.-
- 20.Van Heyningen W.E,(1941); Biochemical Journal (35-1257;35-884).-
- 21.Sordelli A; Ferrari J; Manzullo; R.Navarro Viola; C. De Simone;
(1944) En prensa Revista del Instituto Dacteriológico "Carlos
Malbrán".-
- 22.Hewitt y Todd,(1939); Journal of Path. and Bact. 49-45.-
- 23.Todd W.E.(1941) Brit. Journal Exp. Path. 22-172.-
- 24.Steawr Sarah E.(1940) Public Health Report 55-753.-
- 25.Nagler F B O (1939) Brit. Journal Exp. Path. 20-473.-