

Tesis de Posgrado

Reacciones de precipitación en gel de sistemas antígeno - anticuerpo

Eiguer, Teresa

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Eiguer, Teresa. (1957). Reacciones de precipitación en gel de sistemas antígeno - anticuerpo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0935_Eiguer.pdf

Cita tipo Chicago:

Eiguer, Teresa. "Reacciones de precipitación en gel de sistemas antígeno - anticuerpo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0935_Eiguer.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REACCIONES DE PRECIPITACION EN GEL DE SISTEMAS

ANTIGENO-ANTICUERPO

Resumen de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias
Químicas, Especialidad Química Biológica

Fundamento:

Las técnicas de precipitación en gel, consisten en provocar, en el seno de un gel, como medio de difusión, la reacción del antígeno con su correspondiente anticuerpo. Es un procedimiento que presta al ensayo de precipitinas y anticuerpos de floculación, un alcance que amplifica sus ya extraordinarias condiciones analíticas.

Al provocarse la reacción en el seno de un gel, el aspecto de la reacción estará influenciado por lo menos por tres factores: la velocidad de difusión del antígeno, la del anticuerpo y la poca solubilidad del complejo formado. Esto tiene como consecuencia que la parte visible de la reacción se produzca en distintas formas, según las condiciones y de manera muy nítida. Así, cuando se enfrenta un antígeno simple con su correspondiente anticuerpo, se producirá una sola zona de precipitación, que puede ser en forma de línea fina. Tratándose de reactivos que son complejos, naturalmente o por mezcla, cuyos componentes o los resultados de sus reacciones, difieren en sus propiedades físico-químicas (velocidad de difusión de los elementos reaccionantes, solubilidad del precipitado formado), habrá distintas zonas de reacción, que se pondrán en evidencia ya sea por anillos o líneas más o menos bien diferenciados.

Esta característica que presta el gel a las reacciones de precipitación, es justamente lo que permite obtener un análisis más completo, dilucidando el número de sistemas reactivos en juego y con técnicas más desarrolladas, la comparación entre dos o más reacciones ejecutadas en la misma forma (simultáneamente).

Res. de Tesis: 955

Antecedentes:

Teniendo en cuenta las amplias perspectivas ofrecidas por el método señalado, se comenzó el trabajo con una reseña bibliográfica que pasa revista a las técnicas conocidas para estudiar la reacción antígeno-anticuerpo en soportes gelificados. Seguidamente, se describieron los antecedentes considerados para la parte experimental.

Trabajo experimental:

De acuerdo con los antecedentes considerados las experiencias se orientaron en dos líneas: series de ensayos en tubos y cubetas y otras en placas de Petri, con diversas variantes. Se describió la preparación de los reactivos y medios de difusión, antígenos e inmunosueros; la técnica fotográfica utilizada y por último, las condiciones elegidas para efectuar el mecanismo de las reacciones. Se estudiaron tres sistemas: diftérico, tetánico y estafilocócico.

El método en tubo consistió en colocar en el fondo el suero mezclado con gel, luego una columna central, también gelificada, sobre la que se vertió el antígeno. Se introdujo una modificación ventajosa, consistente en gelificar la capa antigénica, con lo cual se uniformó la difusión de los reactivos. Si bien esta técnica ofreció mayor sensibilidad en el desarrollo de las líneas de precipitado formadas en la columna central, su interpretación fué dificultosa, por lo cual se adoptó definitivamente el método en placa. En éste, las sustancias reaccionantes se colocaron en pequeños cilindros de vidrio dispuestos en forma triangular entre dos placas de gel superpuestas. Cabe destacar que el agregado de gelatina al medio de difusión de agar constituyó una variante de interés, pues produjo mayor transparencia del medio y en algunos casos aceleró la formación de líneas.

La disposición triangular señalada permitió la comparación simultánea de distintos antígenos y sueros.

Los sistemas diftérico y tetánico analizados permitieron observar dos líneas principales.

Finalmente, se realizaron experiencias que demostraron la posibi-

lidad de crear espectros artificiales, mediante variaciones de técnica, tales como el recargado de las sustancias reaccionantes, que son un llamado a la prudencia en la interpretación de los resultados

Por otro lado, la técnica de precipitación en gel desarrollada, ha permitido demostrar la sutileza del método para observar diferencias de estructura en los reactivos estudiados.

Teresa Eiguera

TERESA EIGUER

Año 1957

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REACCIONES DE PRECIPITACION EN GEL DE SISTEMAS
ANTIGENO-ANTICUERPO

TESIS
Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas
Especialidad Química Biológica

TERESA FIGUER

Año 1957

TESIS 955

Deseo expresamente dejar constancia de mi reconocimiento al Dr. Héctor Sosa, por haberme señalado el camino hacia la investigación y el haber hecho posible la realización de este trabajo mediante sus consejos y enseñanzas.

Mi agradecimiento al Dr. Raúl Ferramola y a todas las personas del Instituto Malbrán, en donde se efectuaron las experiencias, que me han brindado su colaboración en una u otra forma.

PERNA

INTRODUCCION

Las técnicas de precipitación en gel, cuyo desarrollo es objeto del presente trabajo, consisten en provocar en el seno de un gel como medio de difusión, la reacción del antígeno con su correspondiente anticuerpo. Es un procedimiento que presta al ensayo de precipitinas y anticuerpos de floculación, un alcance que amplifica sus ya extraordinarias condiciones analíticas.

Como en realidad no es más que un perfeccionamiento de los métodos de observación de las reacciones de precipitación y floculación, es conveniente hacer una somera revisión de los antecedentes de estos procedimientos, antes de entrar en el tema.

La primera comunicación que se tuvo sobre las reacciones de precipitación se debe a Rudolph Kraus (1897), que fué más tarde meritorio director del Instituto Bacteriológico (hoy Instituto Nacional de Microbiología). Estudiando las propiedades del suero anticolérico encontró que al agregarlo a un filtrado de cultivo del vibrión del cólera, e incubarlo a 37°C., se producía una turbidez en el líquido seguida de floculación, quedando el sobrenadante límpido.

Un precipitado similar se formó al mezclar suero antitífico con filtrado de cultivo del bacilo de Eberth (Salmonella typhi), comprobándose la especificidad de la reacción.

Nicolle, en 1898, y otros investigadores, confirmaron el descubrimiento de Kraus.

Charrin y Roger, en 1889, casi simultaneamente, observaron por vez primera el fenómeno de aglutinación específica, al emplear suspensiones bacterianas.

Más tarde, el mismo fenómeno fué notado por Grunbaum (1896), Widal (1896) y Widal y Sicard (1897). Las bacterias sensibilizadas por las aglutininas, sustancias específicas contenidas en el suero de animales inmunizados, se aglomeran en presencia de concentraciones adecuadas de electrolitos, depositándose, bajo la acción de la gravedad, los grumos formados.

Otros autores aplicaron luego las reacciones de precipitación para la determinación cuantitativa de diferentes materiales biológicos.

FENÓL

Así, Ramon, en 1922, describió el método de floculación para titular toxina y antitoxina diftérica.

Dean y Webb (1926), con su método de las proporciones óptimas, analizaron en detalle las condiciones más favorables para la formación de los precipitados en experiencias de floculación y fijación del complemento, demostrando la gran importancia de las relaciones en que deben mezclarse los constituyentes.

Luego Heidelberger (1932-39), aportó numerosa información describiendo el método que permite la comparación cuantitativa de sistemas precipitantes simples.

Es así como fué creada una técnica cuyo alcance ha superado a los métodos químicos.

Entre proteínas que se comportan en forma idéntica frente a los reactivos químicos, como ser albúmina de liebre y conejo (Uhlenhuth 1905), la diferenciación con los métodos inmunológicos, por las reacciones de precipitación es clara, fácil y nítida. Así pueden distinguirse especies muy vecinas y hasta distintas proteínas dentro de una misma especie. Como ejemplo interesante pueden recordarse:

1°) la diferenciación antigénica entre albúminas y globulinas de un mismo animal.

2°) la obtención de anticuerpos con proteínas del propio animal, como las del cristalino. Debe recalcarse que el suero obtenido puede reaccionar con albúmina de cristalinos de otras especies.

Es decir que, si bien a veces esta técnica permite diferenciar la albúmina de una especie determinada, en casos especiales llega a adquirir características que llamamos especificidad de órgano: un anticuerpo reacciona con la proteína de un órgano determinado proveniente de otro animal.

Ahora bien, estas reacciones de precipitación, de resultados tan delicados como método analítico, adquieren una nueva variante cuando se ejecutan en un medio gelificado.

Al provocarse la reacción en el seno de un gel, el aspecto de la reacción estará influenciado por lo menos por tres factores: la velo-

cidad de difusión del antígeno, la del anticuerpo y la poca solubilidad del complejo formado. Esto tiene como consecuencia que la parte visible de la reacción se produzca en distintas formas, según las condiciones de la experiencia y de manera muy nítida, siempre que no intervengan otros tipos de fenómenos ajenos a la reacción antígeno-anticuerpo, como ser el fenómeno de Liesegang. (citado por Hedges, 1932)

Así, cuando se enfrenta un antígeno simple con su correspondiente anticuerpo, se producirá una sola zona de precipitación, que puede ser en forma de línea fina. Tratándose de reactivos que son complejos naturalmente o por mezcla, cuyos componentes, o los resultados de sus reacciones, difieren en sus propiedades fisicoquímicas (velocidad de difusión de los elementos reaccionantes, solubilidad del precipitado formado), habrá distintas zonas de reacción, que se pondrán en evidencia, ya sea por anillos o líneas, más o menos bien diferenciados.

Esta característica que presta el gel a las reacciones de precipitación es justamente lo que permite obtener un análisis más completo, dilucidando el número de sistemas reactivos en juego y con técnicas más desarrolladas, la comparación entre dos o más reacciones ejecutadas en forma simultánea.

El plan de trabajo a realizar es el siguiente :

Primera parte:

Estudio bibliográfico

- a) Historia
- b) Antecedentes considerados en el trabajo experimental

Segunda parte:

Trabajo experimental

- I) Material empleado
 - a) Preparación del medio de difusión
 - b) Reactivos y forma de obtención
- II) Técnicas de difusión
 - a) Método en tubos y cubetas de caras paralelas
 - b) Método en placa y sus variantes

Discusión y conclusiones

Resumen

PRIMERA PARTE

ESTUDIO BIBLIOGRAFICO

H I S T O R I A

Bechold (1905) fué el primero en demostrar la formación de un precipitado localizado, cuando un antígeno (suero de cabra), difunde en un medio gelificado (gelatina) que contiene el anticuerpo homólogo. Probablemente él observó los dos anillos producidos, como debidos al fenómeno de Liesegang y no a una precipitación de dos sistemas diferentes.

Ascoli y Valenti (1910), por superposición del antígeno y anticuerpo precipitante, obtuvieron un resultado efectivo en el diagnóstico del carbunco bacteriano. Después de mantener en ebullición el tejido sospechoso, con el fin de liberar el antígeno termoestable (polisacárido) y una vez frío el filtrado, fué agregado lentamente al suero específico respectivo (carbuncloso), evitando la mezcla de ambos líquidos. La aparición de un anillo de precipitado en la zona de separación fué considerada como reacción positiva.

Observaciones similares a las de Bechold fueron realizadas por Reiner y Kopp (1927), al difundir suero de cerdo en gel de agar conteniendo suero de conejo anti-cerdo y anti-caballo, desarrollándose alrededor de cinco o seis anillos.

Nicolle, Césari y Debains (1920), tratando de obtener una diferenciación más nítida, modificaron la técnica de Ascoli, aplicándola a la titulación de toxinas diftérica y tetánica y las correspondientes antitoxinas. Ellos determinaron la más baja concentración de uno de los componentes, capaz de producir un disco visible cuando difunde en un gel conteniendo una concentración conocida del otro componente. Los resultados obtenidos fueron comparables a la titulación in vitro y a los hallados por inoculación en animales.

Sia y Chung, en 1932, lograron la identificación de los distintos tipos de neumococos, al observar la formación de opacidades anulares alrededor de las colonias desarrolladas en una base de agar que contenía el suero antineumocócico homólogo. La naturaleza de la reacción

fué confirmada por experiencias que demostraron la especificidad de estas opacidades para cada tipo.

Petrie, en 1932, extendió estos métodos al estudio de meningococos y Shigella dysenteriae, al observar halos alrededor de las colonias que desarrollaron cuando sembró dichas bacterias en placas de agar conteniendo los sueros homólogos. Estos halos consistían en un precipitado formado por interacción del polisacárido específico con el correspondiente anticuerpo, y la capacidad para producirlos se tomó como "test" para distinguir las variaciones lisa y rugosa (Sy R).

En 1935, Hanks mezcló antígeno con gelatina y lo cubrió con diluciones seriadas de anticuerpo.

En 1943, Petrie y Steabben usaron el procedimiento para reconocer clostridias toxigénicas, aceptándose como reacción positiva la formación de anillos concéntricos debidos al fenómeno de Liesegang.

En estudios posteriores intentó explicarse las causas de la multiplicidad de los componentes antigénicos en las reacciones de precipitación en gel, ya que la inmunquímica sólo contaba con métodos aproximados para su determinación.

Corresponde a Oudin, quien comenzó sus trabajos en 1946, la investigación más completa sobre la precipitación de sistemas antígeno-anticuerpo, pues sugirió la posibilidad de determinar el número de antígenos presentes en una mezcla, por producción de diferentes zonas de precipitación en tubos que contenían gel.

Otros autores tomaron como base el procedimiento de Oudin para ensayarlo en diversos sistemas.

Ouchterlony, en 1948, inició una serie de experiencias usando placas de Petri, que significaron una nueva ruta. Entre ellas (1949 a), estimó la toxicidad de cepas de bacilos diftéricos, demostrando la identidad de la toxina diftérica, cualquiera sea la cepa que la segrega.

Elek (1948), con el mismo propósito, sugirió las razones de las posibles causas en el fracaso de los trabajos de Petrie y Steabben, al tratar de reconocer in vitro la virulencia del C. diphtheriae, extendiendo las observaciones al estafilococo. Obtuvo un gradiente en antitoxina embebiéndola en una tira de papel de filtro que colocó en

un medio especial destinado a la producción de toxina.

En un trabajo posterior (1949), después de algunas consideraciones respecto al análisis suerológico por métodos de floculación en tubos, introdujo el gradiente de doble difusión, al permitir difundir los dos reactivos en una base de agar. La ventaja consistía no sólo en la interacción del antígeno y anticuerpo, sino también en el mantenimiento de una reacción continua y progresiva que llevó a la separación de cada uno de los sistemas reaccionantes.

Carter y Wilson, en 1949, demostraron la utilidad práctica de estas pruebas.

Elek y Levy (1950), enumeraron los antígenos hemolíticos de diferentes cepas toxigénicas de estafilococos, con la técnica basada en el principio del gradiente de doble difusión. Así, encontraron que el número principal de líneas producidas por cepas de origen animal, fué significativamente menor que el producido por las de procedencia humana.

En 1950, Munoz y Becker, al comparar los resultados clásicos del análisis inmunoquímico, con la difusión en geles, confirmaron las conclusiones de Oudin respecto a la equivalencia entre el número de bandas de precipitación y el mínimo de sistemas antígeno-anticuerpo presentes en el material examinado.

Pope y colaboradores (1951), gracias a esta técnica, llegaron a demostrar la complejidad del antígeno diftérico purificado por Pappenheim y supuesto puro con los análisis fisicoquímicos.

Bjorklund, en 1952-3, modificando la técnica de Ouchterlony, facilitó el análisis de sistemas inmunológicos complejos, al incorporar previamente al medio de difusión, uno de los componentes del sistema heterogéneo en concentración suficiente. Obtuvo una inhibición completa en la aparición del precipitado correspondiente a dicho antígeno particular, mientras que la difusión y posterior precipitación de los otros componentes no eran influenciados.

Más adelante, en 1954, dicho autor sugirió la posibilidad de estudiar la naturaleza química de ciertos antígenos, mediante la retención de algunas de sus propiedades, después de formado el floculado

con el correspondiente anticuerpo. Usando varios sistemas, permitió desarrollar las líneas específicas en el gel, las que lavadas y ulteriormente tratadas con soluciones colorantes, adquirieron el color en forma selectiva. Así demostró que, bajo ciertas condiciones, las reacciones de coloración son específicas.

En 1953, Oakley y Fulthorpe aplicaron algunas modificaciones al método de Oudin, consistentes en la introducción de una columna de agar o gelatina como centro difusor, entre las soluciones antigénicas y los correspondientes antisueros solidificados en la base del tubo. Estimaron así, la probabilidad de que el total de líneas producidas, era el mínimo número de antígenos contenidos en la mezcla difusora, pudiéndose además usar la técnica para demostrar la complejidad de mezclas biológicas, o seguir su purificación.

Jensen y Francis, en 1953, obtuvieron bandas de precipitación específicas con diferentes cepas de virus gripal.

Ambrose y Easty(1953), por medio de una técnica interferométrica, tomaron fotografías muy nítidas de las bandas, formadas en geles que contienen el inmunosuero. Por ser un método novedoso e interesante, se describirá con más detalle.

El aparato usado por los autores citados, está constituido esencialmente por dos placas de vidrio, ópticamente planas, con una de las superficies plateada, para dar un cinco por ciento de transmisión de luz. Las placas se colocan enfrentadas horizontalmente sobre la platina de un microscopio y entre ellas se dispone una célula que contiene gel y donde se ha efectuado la reacción con el sistema antígeno-anticuerpo. Luego se ajustan paralelamente y se ilumina desde abajo con luz monocromática, cuyo ángulo de incidencia puede variarse mediante una ranura movable. Se observaron así franjas de interferencia paralelas, de camino óptico constante, debidas a la reflexión producida por los complejos formados.

Si en alguna región, por ejemplo, hay un incremento en el índice de refracción, las franjas rectas se curvarán de modo de no variar el camino óptico, pues un aumento en el índice de refracción debe compensarse por una menor distancia entre las placas. Esto ocurre cuando se acumula el complejo en una zona particular, correspondiendo el pico de

la inflexión al punto de equivalencia. La cantidad de antígeno y anticuerpo combinada antes del comienzo de la precipitación puede estimarse por el área bajo el pico y espesor del gel, dado que los valores para los índices e incrementos específicos de refracción, son casi constantes para la mayoría de las proteínas.

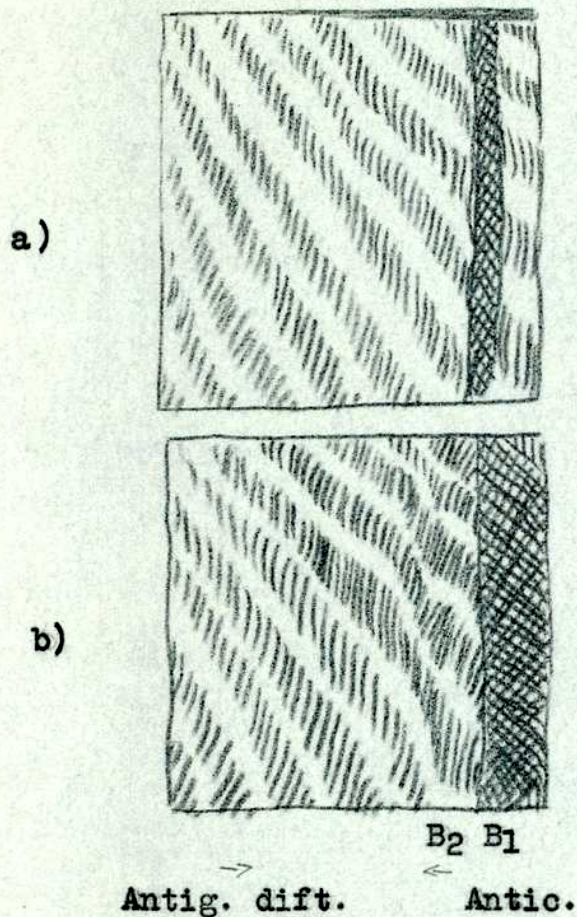


Fig. 1

nía la misma apariencia de la B₂, dando picos en las bandas de interferencia, pero siendo completamente indetectables por otros medios.

Rafyt, Chamsy y Delsal (1954), enumeraron, por una parte, los antígenos presentes en filtrados de cultivos tetánicos y por otra, controlaron su purificación, llegando a la conclusión de que la toxina tetánica es un conjunto complejo de antígenos o haptenes liberados en el medio de cultivo, pudiendo aumentar por autólisis bacteriana o degradación de las moléculas gruesas en pequeños fragmentos, debida al envejecimiento del cultivo.

En el mismo año, Pierre Grabar, señalando la imposibilidad de demostrar el grado de pureza u homogeneidad de una preparación, por un sólo método analítico, así como la diferente sensibilidad que pueden presentar dichos métodos, efectuó un estudio sobre las proteínas con ayuda de la inmunología. Usó para ello una técnica combinada, con-

La figura 1) muestra los sistemas de bandas observados en un gel en el que difunden antígenos y anticuerpos. En a), se formó una banda de precipitado (B₁). En b), la banda de precipitado (B₁) observada después, se ha ensanchado y los picos de las bandas cruzan a la izquierda de (B₁). Estos picos (B₂), corresponden al punto de equivalencia de un segundo sistema antígeno-anticuerpo

No se detectó ningún precipitado en (B₂), cuando se tomó la fotografía b). Antes de que apareciera precipitado en la banda B₁, ésta te-

sistente en una separación electroforética en medio gelificado, de los constituyentes de mezclas biológicas y una reacción de precipitación específica sobre el mismo preparado, que permite revelar la presencia de los distintos componentes.

Al mismo tiempo, otros autores confirmaron en sendas experiencias la valiosa utilidad de la técnica de difusión en geles.

Relyveld, Turpin y colaboradores (1954), obtuvieron un método sencillo de purificación del toxoide diftérico y controlaron las diferentes fracciones mediante la floculación en medios gelificados.

Guillaumie, Kréguer y Geffroy (1954), determinaron las zonas formadas por difusión de las toxinas del Cl. septicum y Cl. oedematiens en sueros antigangrenosos gelificados.

En el año 1953, Oudin introdujo una modificación en su técnica con el fin de producir mayor densidad y diferenciación en las zonas de precipitación, consistente en reemplazar la solución antigénica después de varias horas de difusión, por una solución de cloruro de sodio 0.85 %. Este procedimiento debe realizarse sobre un cierto número de tubos idénticos, en tiempos diferentes, de modo que la correspondencia de las zonas en los tubos pueda restablecerse sin dificultad. En esta forma estudió los antígenos contenidos en la fracción del suero humano precipitado por sulfato de amonio a 45 % de saturación, encontrando alrededor de 10 componentes.

Estando el presente trabajo próximo a finalizar, apareció una nueva presentación de Oudin (1955), en la que, además de reseñar los métodos de identificación de antígenos mediante el uso de geles, establece una variante que permite reaccionar varias soluciones gelificadas de antígenos con el mismo inmunosuero, usando cubetas de caras paralelas no cerradas.

ANTECEDENTES CONSIDERADOS EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL

A Al iniciar estos trabajos, se presentaron dificultades en la obtención de datos bibliográficos, por lo que hubo de improvisarse procedimientos, que aunque no originales, como después se supo, dejaron su enseñanza al permitir apreciar los inconvenientes que tuvieron que enfrentar los investigadores.

Oudin (1946) y Ouchterlony (1948), fueron los que dieron a las reacciones de difusión en gel, el impulso y la importancia que tienen actualmente. Conociendo sus rumbos, las experiencias se orientaron en dos líneas : series de ensayos en cubetas y tubos, como lo hiciera Oudin y otras en placas, con diversas variantes, de acuerdo al sistema desarrollado por Ouchterlony.

METODO EN TUBO:

En realidad, se debe a Nicolle, Césari y Debains (1920) el primer intento para titular antígenos y anticuerpos por superposición de los mismos en un medio gelificado. Inspirados en el método de Ascoli (1910), repartieron en una serie de tubos, mezclas de volúmenes iguales (2ml.) de suero de caballo y gelatina 10%, de reacción neutra. Después de solidificarlos en heladera, vertieron cantidades decrecientes de suero de conejo anticaballo, permaneciendo durante dos horas a temperatura ambiente. Se obtuvo así la formación de anillos de precipitado características, en el límite del anticuerpo con el antígeno-gel. El anticuerpo fué determinado por la más baja concentración de suero que produjo dicho anillo.

Con el mismo método, titularon el antígeno previamente concentrado. Posteriormente valoraron toxinas y sueros diftéricos y tetánicos encontrando correspondencia con las titulaciones in vivo.

El método original de Oudin (1948), consistía en superponer la solución de antígeno que se quería analizar, al suero previamente gelificado. Primeramente distribuyó en una serie de tubos y cubetas de caras paralelas, la mezcla del inmunosuero con solución de agar 0.6% clarificado por coagulación en caliente con suero normal de conejo. Los tubos fueron sometidos a un tratamiento previo, pues contrariamente a la gelatina, el agar no se adhiere al vidrio, razón por la

cual al superponer el antígeno al gel de inmuosueros, observó la formación de un precipitado entre la pared del vidrio y la columna gelificada, haciéndose irregulares las líneas de precipitado resultantes, lo cual dificultó la lectura posterior. Este inconveniente fué subsanado revistiendo la superficie interior con una fina capa



Fig, 2

de gel. Para ello calentó los tubos a 60-70°C. llenándolos con una solución de agar 1% a la misma temperatura. Después de volcar, los colocó en baño a 0°C. y desecó en vacío en presencia de ácido sulfúrico. Luego de agregar las soluciones antigénicas, recubrió los tubos con cera y bálsamo de Canadá, manteniéndolos a temperatura uniforme (22.5°C.) durante 8-10 días y registrando fotográficamente. Este registro fué mejorado por el uso de las cubetas.

Sistemas de reacción usados por Oudin : Como reactivos usó los por él llamados sistemas precipitantes simples, formados por un sólo antígeno, tales como ovoalbúmina de pollo, albúmina de suero de caballo, antígeno somático O de Eberthella typhosa, productos de hidrólisis como haptene poliósido de neumococo, poliósido O de E. typhosa y otras fracciones. Los sistemas precipitantes complejos, comportaban varios antígenos que él llamó completos; los múltiples se obtenían cuando varios sistemas simples o complejos reaccionaban en el mismo tubo, estando al comienzo de la reacción los antígenos reunidos en el seno de la misma solución y los anticuerpos en el mismo inmuosueros o mezcla de inmuosueros. Oudin consideraba como sistemas múltiples la mayor parte de los humores del organismo animal, o extractos bacterianos no fraccionados, cuando reaccionaban con un suero obtenido después de inmunizar los animales con inyecciones repetidas del mismo líquido.

Factores que influyen en la reacción : Al realizar las condiciones experimentales mencionadas, Oudin observó que la combinación de los antígenos y sus correspondientes anticuerpos, daba origen a compuestos insolubles y específicos cuya densidad (cantidad de precipitado por unidad de volumen) se admitió como constante en todos los puntos

equidistantes de la interfase. Si la precipitación tenía lugar en la capa de anticuerpos, se observaba una zona de precipitado alejándose de la interfase en el curso del tiempo. Del borde inferior de dicha zona hacia la interfase, la densidad de precipitado pasaba por un máximo, decreciendo por exceso de antígeno (zona de inhibición).

Es decir que, cuando la concentración de la sustancia que difunde permanece constante en la solución en contacto con el gel, la distancia de la frontera a la interfase aumenta con el tiempo: es proporcional a su raíz cuadrada.

Al observar más de un máximo de precipitado, Oudin concluyó que el número de máximos o fronteras desarrolladas, debía considerarse como un límite inferior del número de antígenos presentes en la solución; podrá ser superior si la precipitación debida a uno de los antígenos se produce totalmente en la capa de antígenos, bajo ciertas condiciones de concentración, o si los máximos estuvieran situados a dos niveles muy próximos para poder ser distinguidos.

La eventualidad de un fenómeno de Liesegang, caracterizado por una floculación que progresa en forma periódica o rítmica, pero no continua (estriás inmóviles), pondría en defecto la conclusión de Oudin, aunque él no lo observó en sus experiencias.

Condiciones necesarias para la formación del precipitado: Para que se produzca la aparición de la zona de precipitado, se requiere una concentración mínima de antígeno. Como la distancia de esta zona a la interfase aumenta con el tiempo, para un tiempo constante, la distancia franqueada varía en el mismo sentido que la concentración del antígeno y en sentido inverso a la de los anticuerpos.

Cualquiera sea la concentración inicial del antígeno, existe un valor de la concentración de los anticuerpos debajo del cual el máximo de densidad de la zona es débil como para poder ser perceptible. Para cada concentración de anticuerpo, existe un valor de la concentración inicial del antígeno, debajo del cual el precipitado no aparece en el gel, sino que se forma en la capa líquida de la solución antigénica.

Oudin estudió la influencia de las principales variables sobre el aspecto de la zona de precipitación, con la ovoalbúmina de pollo cris-

talizada, estableciendo que el máximo de densidad variaba poco con el tiempo y con la concentración inicial del antígeno y variando, en el mismo sentido que la concentración de los anticuerpos. La mínima concentración de ovoalbúmina puesta en evidencia fué del orden de 0.01 mg.ml. Para otros antígenos será diferente.

Causas de error y su eliminación: Entre las posibles causas de error en la interpretación de las experiencias, Oudin señaló las precipitaciones no específicas debidas a productos bacterianos, estrías por cambios bruscos de temperatura o por fenómenos de Liesegang. Estos accidentes fueron evitados tomando precauciones y efectuando experiencias en serie.

Resultados: En los casos en que un sólo antígeno reaccionaba, no se observó más que un sólo máximo de densidad de precipitado. Con las cuatro albúminas ensayadas, la zona presentaba el límite inferior muy preciso, siendo en cambio difuso cuando se trataba de antígenos bacterianos.

En una segunda parte, definiendo los sistemas precipitantes complejos, estudió la reacción entre dos antígenos con los anticuerpos homólogos de uno sólo de ellos: albúmina de pollo y perro y antígeno somático O y poliósido O de E. typhosa. Llegó a la conclusión que la zona del antígeno homólogo es siempre la más próxima a la interfase.

En cuanto a los sistemas múltiples, demostró que la influencia mutua de los diversos antígenos reunidos en una solución es nula o pequeña. La imagen dada por la reacción de los mismos con los anticuerpos correspondientes, indica la superposición de las imágenes que cada uno daría si reaccionara solo.

Técnicas de identificación de los antígenos: Después de algunas consideraciones sobre las posibilidades de aplicación del método de difusión y teniendo en cuenta la naturaleza, desconocida a veces, de algunos líquidos biológicos, indicó algunos medios para lograr su identificación. Así, estableciendo la identidad o semejanza específica de los antígenos de un determinado origen, con los antígenos de otro, o relacionando la zona de un antígeno aislado, con la zona del mismo antígeno perteneciente a una mezcla. En este caso, por ejemplo se agotaba el inmunosuero del sistema múltiple, por la solución que

contenía el único antígeno y luego se hacía reaccionar comparativamente la mezcla de antígenos, con el inmunosuero no modificado y con el adsorbido, ambos en la misma concentración. La zona que estuviera ausente en uno de los tubos, sería la específica del antígeno contenido en la solución original.

Otra manera sería enriquecer la mezcla de antígenos estudiada, agregándole en cantidad suficiente la solución de antígeno único, lo cual produciría un aumento de la zona específica del antígeno, en relación al testigo.

De todo lo que precede, concluyó Oudin que el número de antígenos contenidos en una mezcla tal como un líquido biológico, es superior o igual al número de zonas o máximos de densidad de precipitado que se observa cuando se hace reaccionar esa mezcla con un inmunosuero, dando precipitados específicos. La probabilidad de una apreciación exacta del número de antígenos, es a priori más grande, cuanto más específico sea el suero correspondiente a la solución en estudio.

En 1953, Oakley y Fulthorpe introdujeron una modificación interesante y ventajosa al método de Oudin, al intercalar entre el antígeno y el anticuerpo gelificado, una columna central de agar, que

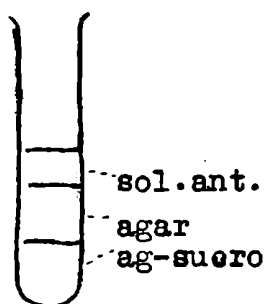


Fig.3

facilita el desarrollo y la mejor perceptibilidad de las reacciones de difusión. Ellos usaron tubos Lambeth (8x0.8 cm.), de diámetro uniforme, en los que vertieron mezclas de volúmenes iguales de agar 2%, filtrado en caliente y enfriado a 54°C. y suero o diluciones de suero, a la misma temperatura, cuidando de no tocar el interior del tubo y de evitar la formación de burbujas.

Sobre el fondo, una vez frío, colocaron agar 1%, preservado con ortocresol 0.5%, fundido y llevado a 54°C., hasta dar una columna central de altura uniforme (Fig.3). Esta dependía de las circunstancias: canto más corta era, más rápido y densas aparecían las líneas, pero también más anchas. Columnas más largas darían bandas mejor separadas pero más tenues, tardando más en desarrollarse. Ellos usaron una altura de 8mm., sobre la que vertieron el filtrado bacteriano,

constituido por C. diphterriae y Cl. welchii A, B, C y D. Luego cerraron los tubos con tapones de goma e incubaron a 37°C., obteniendo resultados satisfactorios generalmente a las 48 horas. El tiempo de aparición de las líneas y su exacta posición, dependía de las concentraciones relativas de los antígenos y anticuerpos y de sus velocidades de difusión, ya que estas no son las mismas para todos los antígenos de una mezcla, aunque sí pueden serlo para los anticuerpos. Resultados: Líneas de distinta intensidad, se interpretaron como debidas a antígenos diferentes (siempre en concentración adecuada respecto al suero).

Además, señalaron una posibilidad de error, muy necesario de tener en cuenta: el por ellos llamado splitting de las líneas, es decir, la separación horizontal del disco de floculación, en dos de aparentemente igual densidad, que puede producirse cuando se prolonga mucho la incubación. Este efecto pudo ser distinguido de la reacción verdadera.

Si la concentración del antígeno fues bastante mayor que la del suero, la línea se formaría debajo de la columna central, dificultando o impidiendo su visión.

Con esta consideración podría favorecerse el desarrollo de líneas correspondientes a componentes débiles o complementarios, por incremento de la concentración de las mezclas a ensayar.

Del mismo modo, con un exceso de suero, las líneas se desplazarían hacia arriba y si la reacción se prolongara, originaría la disolución del precipitado en un exceso del anticuerpo que difunde, formándose en un nivel superior.

También demostraron que un suero agregado a mezclas antigénicas, puede ensayarse contra uno standard, por su capacidad de mover líneas sobre la columna central y que muchos de los antígenos de filtrados bacterianos responsables de la formación de líneas, eran toxinas bacterianas bien conocidas.

En forma similar, si dos líneas se sobrepusieran, la adición de suero a la capa superior permitiría separarlas, haciéndolas mover hacia arriba a distintos niveles. (Figura 4).

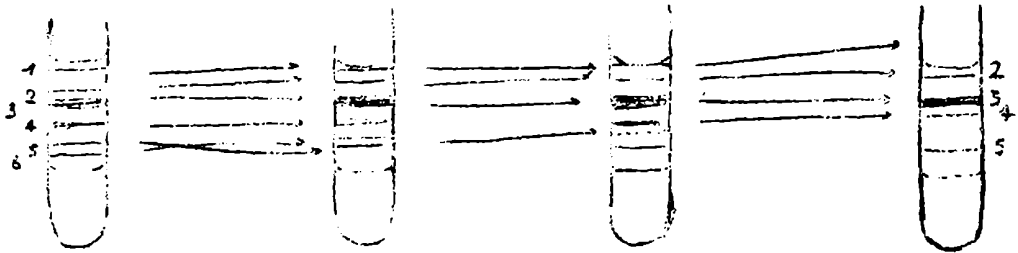


Fig. 4 .- Adición creciente del antisuero al filtrado

Columna de difusión mostrando el efecto sobre un sistema complejo de líneas, de la adición creciente del antisuero al filtrado. Las líneas están numeradas y su movimiento se sigue por flecha. El antisuero agregado al tope no tiene evidentemente anticuerpos contra los antígenos responsables de las líneas 3 y 5; posee algunos anticuerpos para los otros antígenos.

Así, con este estudio, Oakley confirmó las observaciones de Oudin, al aceptar que el número de líneas producidas en una columna de difusión, es el número mínimo de antígenos presentes en la mezcla antigénica que difunde y señaló la utilidad del método para demostrar la complejidad de algunas muestras y seguir su purificación.

METODO EN PLACA:

Como se mencionara al principio, Ouchterlony desarrolló el método de difusión en numerosas experiencias en las que empleó cajas de Petri.

El procedimiento consistía en cubrir el fondo con una delgada película de agar clarificado con cloruro de calcio. Sobre dicha superficie colocó un molde metálico recubierto de parafina. Después de verter otra capa de agar y enfriar, separó cuidadosamente el metal, quedando una depresión en la capa superficial. En esta forma obtuvo varias depresiones, ya sea en ángulo recto o colocados según los vértices de un triángulo. Estos surcos fueron llenados con los reactivos a ensayar y recargados a intervalos de 12 o 24 horas. Posteriormente, debido a inconvenientes, se eliminó el recargado de líquido. La temperatura se mantuvo a 37°C. y las observaciones se registraron diariamente.

Ouchterlony mostró así que, si se permiten difundir preparaciones de dos antígenos diferentes hacia el mismo suero, pueden detectarse

pequeñas diferencias en la composición antigénica.

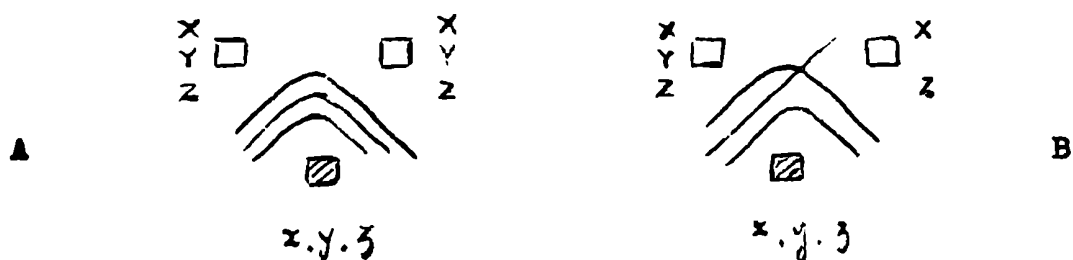


Fig. 5 .- X, Y, Z, : antígenos
x, y, z : anticuerpos correspondientes
En A, ambas preparaciones de antígeno son idénticas.
En B, un antígeno está ausente de la preparación.

Es decir que, según se ve en la figura, idénticos precipitados se funden en una simple banda o línea, cruzando sin interferencia cuando se trata de antígenos distintos.

Además, por absorción del suero con antígenos apropiados, o por separación o destrucción de antígenos en la mezcla, la aparición de líneas en el espectro puede ser evitada o selectivamente prevenida.

En general, Ouchterlony confirmó las conclusiones encontradas por Oudin respecto a los factores que influyen las reacciones de difusión. En uno de sus trabajos (1950), describió la técnica de producción de la toxina diftérica, obteniendo correspondencia con experiencias en animales. Encontró en el suero antidiftérico comercial por lo menos cuatro anticuerpos diferentes junto a la antitoxina.

El mérito principal que le cabe a este investigador, a nuestro juicio, reside en haber facilitado la comparación de diferentes preparados de antígenos e inmunosueros simultáneamente, aunque sin desmedro respecto de sus restantes conclusiones.

SEGUNDA PARTE

TRABAJO EXPERIMENTAL

Para su descripción se procederá en dos etapas :

Por un lado, la preparación de los reactivos y medios de difusión, antígenos, sueros y geles; por el otro se tratarán las técnicas utilizadas para estudiar los diferentes sistemas de reacción.

MATERIAL EMPLEADO

PREPARACION DEL MEDIO DE DIFUSIÓN

Se partió de una solución de gelatina al 10% y otra de agar al 2%.

Gelatina 10% : Se cortan 10g. de gelatina neutra de buena calidad en pequeños trozos y embeben en agua destilada fría, guardando durante 24 horas en heladera. Se vierte el agua y funde alrededor de 86°C. Después de completar el volumen hasta 100 ml., se filtra en estufa a 37°C., por papel plegado, se adiciona de merthiolate 1:10.000 y conserva en frío.

Agar 2% : 20g. de agar cortado en finas tirillas se lavan en agua destilada durante 24 horas. Después de decantar se completa a 1 litro y funde en baño maría. Como las reacciones de difusión requieren un gel límpido, se siguieron tres métodos para su clarificación: a) filtración, b) centrifugación y c) precipitación con cloruro de calcio. No se usó la purificación con agregado de proteínas coagulables debido a la dificultad de su total separación y a su posible interferencia en la reacción.

a) Filtración: El agar fundido según se indicó, se filtró dos veces en caliente por buchner conteniendo una capa de papel en pasta. Las primeras porciones, acuosas por la dilución dada por la papilla, se desecharon y el resto se dejó congelar en heladera. Luego se desheló con el fin de separar el agua y las impurezas que pudiera contener. Esta operación se repitió dos veces en días consecutivos. A la esponja de agar obtenida, se le agregó agua destilada

hasta el volumen requerido, se fundió y volvió a filtrar en caliente por buchner dos veces, distribuyéndose luego en tubos que se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos.

Para evitar la filución que se produce al filtrar por pasta de papel, se ensayó una filtración por Seitz con membrana clarificante, obteniéndose mayor limpidez.

b) Centrifugación: Después de lavado y fundido el agar en baño maría, se distribuyó en tubos y centrifugó durante media hora a 3500 revoluciones, en centrífuga Internacional con cabezal angular. Una vez solidificado, se separó el gel con ayuda de espátula, cortando y desechando la porción del fondo que contenía las impurezas sedimentadas. Luego se volvió a fundir y repitió el procedimiento, agregando fenol al 4% como conservador.

c) Precipitación con cloruro de calcio: El agar 2% fundido, se precipitó con solución de cloruro de calcio hasta concentración final del 5%, calentando suavemente alrededor de media hora. Luego se centrifugó como se indica en b). Los trozos separados se lavaron, primero en agua corriente y después en agua destilada, durante tres días, llevando al volumen requerido. Se volvió a fundir y centrifugar, eliminando así el precipitado que pudiera estar incluido en el gel.

REACTIVOS Y FORMA DE OBTENCION

I.- ANTIGENOS

- 1) Toxoide diftérico concentrado y purificado por precipitación en PUNTO isoelectrico: a) del 28-1-54 (650 Lf.ml.); b) 215 (1200Lf.ml)
- 2) Toxoide diftérico crudo: (34 Lf.ml.). Este toxoide fué concentrado en tres formas:

a) Por evaporación en vacío: Dos placas de Petri conteniendo 10 ml. de toxoide crudo cada una, se colocaron en desecador en presencia de gel de sílice, se hizo el vacío y después de 24 horas se agregó al residuo 1 ml. de solución fisiológica, obteniéndose una

concentración final de veinte veces.

b) Por ultrafiltración: 100 ml. del toxoide crudo indicado, fueron vertidos, en pequeñas porciones, sobre una membrana de colodio adaptada a un ultrafiltro. Después de efectuar vacío y mantener en heladera 24 horas, se extrajo el residuo seco con 1 ml. del líquido filtrado, repitiendo dos veces más la extracción. El pH se reguló a un valor de 7.4 aproximadamente, con solución de bicarbonato de sodio 5%. La concentración final fué de 25 veces.

c) Por precipitación con sulfato de amonio y liofilización: Un litro de toxoide crudo se precipitó con 700 g. de sulfato de amonio (70%) a 40°C. El material floculado recogido con espátula y el líquido de lavado, fueron puestos en tubos de celofán para diálisis (esterilizado por ebullición). Para evitar la ruptura de los tubos de celofán, por la gran tensión osmótica desarrollada, fueron acondicionados dentro de un armazón de filtro Berckefeld, rellnando los espacios con arena gruesa. En las primeras 12 horas se pasó agua corriente en forma continua, terminando la diálisis en heladera frente a agua destilada renovada hasta no dar reacción de ion sulfato. El valor del toxoide obtenido fué de 500 Lf.ml., y considerándolo insuficiente para algunas experiencias, se procedió a concentrarlo por liofilización. Para ello se usó el dispositivo indicado en la figura

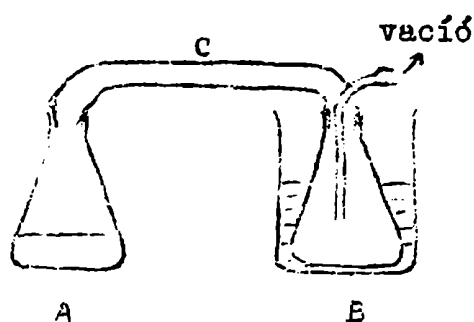


Fig. 5

5, que consta de dos frascos de Erlenmayer A y B, unidos por un amplio tubo de vidrio C, en uno de cuyos extremos se soldó un tubo para conectarlo a la bomba de vacío (Genco Hyvac). Las uniones al tubo fueron selladas con mástic en caliente.

Colocado el dializado en A y congelado, se sumergió B en mezcla de nieve carbónica y etanol, dejando enfriar antes de conectar el vacío. El proceso de sublimación fué acelerado con infrarrojo. Se obtuvo un material fácil y rápidamente soluble en agua, que se diluyó hasta una concentración de 1400 Lf.ml.

- 3) Toxoide tetánico purificado del 18-VIII-54 (534 DT; 1 DT corresponde a 0.1 U.)
- 4) Toxoide tetánico purificado (750 DT).
- 5) Toxoide tetánico no floculante (250 DT)
- 6) Toxoide tetánico concentrado y purificado por sulfato de sodio anhidro, de acuerdo a la técnica de Modern, Ruff y Gatti (Rev. Inst. Malbrán, XV, N°3, 1950-53, 232). Se usó una concentración de la sal del 15%, agregada al antígeno a 35°C. Después de mantener en cámara fría durante 2 horas, se centrifugó y disolvió en agua destilada.
- 7) Toxina tetánica.
- 8) Toxina estafilocócica de 15 Lf.ml.
- 9) Toxina estafilocócica de 40 Lf.ml.
- 10) Toxoide estafilocócico (Toxina formolada al 0.6%, grado de hemólisis menor del 1/5 del valor inicial).
- 11) Toxina estafilocócica Precipitada con sulfato de amonio a saturación y dializada como se indica en (I-2c).

II.- SUEROS

- 1) Suero antidiftérico proteolizado (2000 Lf.ml., proveniente de la Sección Sueros del Instituto Malbrán.
- 2) Suero antidiftérico de procedencia norteamericana (6000 UI. en 3.1 ml.).
- 3) Suero antitetánico purificado (4500 UI.ml.).
- 4) Suero antitetánica purificado (3000 UI.ml.)
- 5) Suero antiestafilocócico (200 UI.ml.)

Estos últimos sueros (3,4 y 5), también fueron producidos por la Sección Sueros del Instituto Malbrán. Todos son proteolizados.

III.- TECNICAS DE MEDICION DE ANTIGENOS Y SUEROS

Las titulaciones en Lf. para los antígenos diftérico y tetánico fueron efectuadas siguiendo la técnica de lectura en óptimo de floculación, según Ramon (1922), en baño maría a 50°C.

Las toxinas estafilocócicas fueron valoradas por su acción hemolítica sobre glóbulos rojos de conejo. Para ello se mezcló 1 ml. de la dilución 1/20 del suero "standard", es decir, LUI, con cantidades crecientes de la toxina desconocida. Se incubó durante media hora a 37°C. y luego se añadió 0.5 ml. de una suspensión de glóbulos rojos de conejo al 5%, que se obtiene lavando 5 ml de sangre de conejo desfibrinada, con solución fisiológica y suspendiéndolos con la misma hasta completar los 100 ml.

La dosis "test" de toxina quedó determinada por el primer tubo que presentó hemólisis después de incubar la mezcla a 37°C., durante una hora. La medición del toxoide estafilocócico se efectuó siguiendo la misma técnica, pero agregando a la mezcla del suero y toxoide, después de completar con 1 ml. de solución fisiológica e incubar a 37°C. media hora, media dosis "test". Se dejó media hora a 37°C. y añadió 0.5 ml. de la suspensión de glóbulos de conejo, leyendo a la hora de incubación los resultados.

Como títulos de los sueros empleados, se tomaron los indicados por el laboratorio productor.

IV.- TECNICA FOTOGRAFICA

Los registros fotográficos fueron hechos por contacto, tomando ciertas precauciones técnicas para evitar la distorsión (Figura 6) :

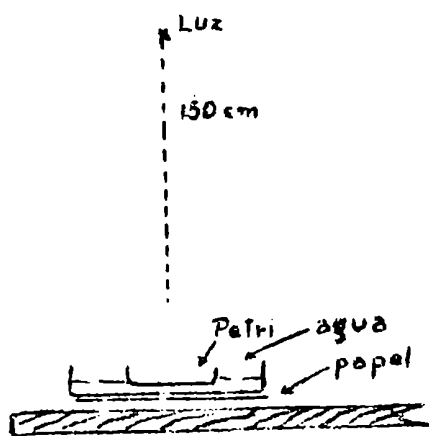


Fig.6

1° Fuente luminosa: Se usó una lámpara puntiforme fijada a 1.5m. de distancia sobre la mesa de trabajo, con interruptor manual.

2° Con el objeto de corregir los defectos de fabricación del material de vidrio empleado, las placas fueron sumergidas en un recipiente con agua y fondo de vidrio ópticamente plano, cuidando de no incluir burbujas.

En esta forma, las imperfecciones de las placas de Petri se redujeron a un mínimo. El papel fotográfico fué colocado inmediatamente debajo del fondo plano del recipiente. Se usó papel al cloro-

bromuro.

En los ensayos con cubetas, como éstas eran de caras paralelas no fué necesario ningún artificio para obtener las pruebas fotográficas.

Para el revelado y fijación se procedió de acuerdo con la técnica habitual.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

TECNICAS DE DIFUSION ENSAYADAS

Para facilitar la descripción de las experiencias, se tomaron como base los distintos tipos de reacción, sin tener en cuenta estrictamente el orden en que fueron ejecutados los trabajos y considerando sólo los de mayor significación.

Por ello, no se describen con detalle los ensayos en tubos y cubetas, destacando con más amplitud lo referente al método en placa, que fué definitivamente adoptado.

METODO EN TUBOS

Los trabajos de Nicolle, Césari y Debains (1920), fueron repetidos con sueros y toxinas diftéricos y tetánicos con el fin de comprobar su efectividad como método de titulación.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. Aunque la formación de líneas es rápida y bastante visible, dicha técnica no permite las lecturas en el punto óptimo de reacción, sino que sólo indica el límite.

Debido a esta razón es que posiblemente haya caído en desuso la técnica de tales autores, residiendo su mención en la importancia histórica.

Siguiendo la técnica de Oudin (1948) al comienzo y aplicando la modificación de Oakley (1953) después, se realizaron algunos ensayos introduciendo también otras variantes que resultaron de mayor utilidad.

Con el método de Oudin, se encontraron inconvenientes en la lectura. La banda de precipitado se formó en la interfase agar-toxoide, o en zonas muy próximas a la misma, impidiendo la interpretación correcta de las experiencias.

Al intercalar la columna central de gel entre el antígeno y el agar-sucro, como lo hiciera Oakley, se facilitó el desarrollo de la

reacción. Los resultados obtenidos fueron más claros, aunque se presentaron también distorsiones de las líneas, debidas al fenómeno de corrimiento del reactivo líquido entre el gel y la pared de vidrio.

Introducción de una variante al método de Oakley

Para evitar el inconveniente recién señalado, pudo haberse recurrido al tratamiento previo de los tubos (utilizado por Oudin), pero se prefirió gelificar también la capa superior del antígeno, como se efectuara con el suero.

Ventajas: Las que se obtuvieron fueron grandes: Desapareció la dificultad mencionada, uniformándose además la velocidad de difusión del antígeno respecto a la del inmunosuero.

Materiales

Se estudiaron los sistemas diftérico y tetánico, con algunos de los reactivos indicados en el capítulo anterior.

Medios de difusión: Además de agar 1%, se empleó gelatina como medio de difusión, en diferentes concentraciones, encontrándose que la concentración del 1% procuraba mejor definición de las líneas.

Modificación del medio de difusión: El agregado de 1% de gelatina a la columna central de agar, constituyó una variante interesante y ventajosa, pues por comparación con las series anteriores, se observó mayor nitidez del medio, lo cual facilitó enormemente la lectura.

Procedimiento

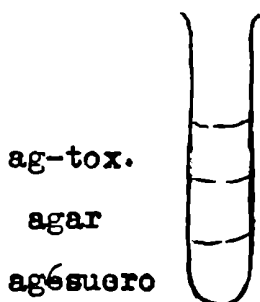


Fig. 7

Las primeras reacciones se efectuaron en tubos de ensayo de 20x1.5 cm., de diámetro uniforme. En el fondo se vertió la mezcla de agar-suero (2ml.), luego la columna central de gel, ya sea de agar, gelatina, o la mezcla de ambas; el volumen dependía de las condiciones necesarias para cada reacción. Todas las diluciones se hicieron con solución de cloruro de sodio al 0.9%. Por último se agregaron 2ml. de toxoide-agar, previamente fundido y llevado a 45°C., lo mismo que las mezclas anteriores.

Los tubos bien tapados se mantuvieron en estufa a 37°C., salvo los que contenían gelatina central, que se incubaron en heladera.

Después de efectuarse numerosas variantes en cuanto a factores que podrían influir en la difusión, se adoptó como límite de tiempo de reacción, ocho días para el sistema diftérico y veinte para el tetánico.

Así, se preparon series a distintas concentraciones de los reactivos, unas con exceso de suero, otras con aumento de antígenos o en valores equivalentes. También se estudió el efecto de distintas temperaturas y acción de electrolitos, a veces agregados al gel de la columna central.

Posteriormente, se usaron tubos de menor tamaño, permitiendo ello reducir los volúmenes de reactivos.

RESULTADOS OBTENIDOS

Durante el desarrollo de las reacciones de difusión, se ha constatado en general, lo examinado por los autores mencionados.

Sin embargo, se considera necesario remarcar la importancia que tiene la concentración de los reactivos, en el número de líneas formadas.

Sistema diftérico : Al comparar series cuyo valor estuvo comprendido entre 1000 y 10 Lf.ml., usando toxoide purificado por precipitación en punto isoelectrico(I-1) y suero proteolizado (II-1), se pudo observar lo siguiente (Fig. 8) :

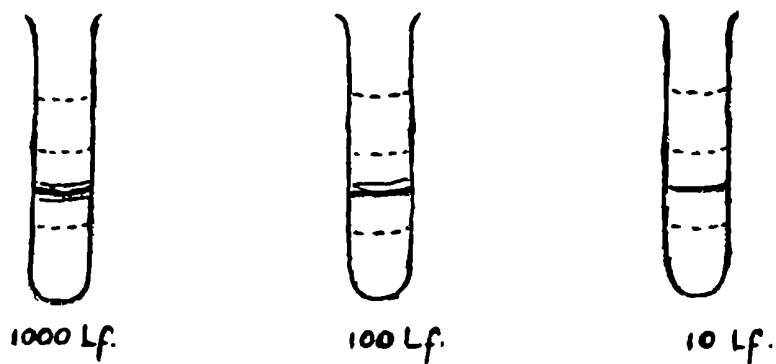


Fig. 8

Con 1000 Lf.ml., una línea de mayor densidad, en el centro de la columna intermedia, y 2 más tenues, a cada lado de la principal.

Con 100 Lf. se formaron 2 líneas, la más débil sobre la central. Con 10 Lf.ml., solamente 1 línea, de menor densidad que la correspondiente a la serie anterior. Cuando se empleó columna central de gelatina, se observó igual número de líneas que con agar, aunque la difusión fué más lenta.

En esta forma, confirmamos la idea de que, para visualizarse la formación de los precipitados producidos por la combinación antígeno-anticuerpo, es necesario sobrepasar cierta concentración límite de los sistemas reaccionantes, ya que los componentes que se encuentran en menor proporción, posiblemente responsables de las líneas secundarias, sólo aparecen por encima de ese valor.

Usando concentraciones muy elevadas se tropieza con la dificultad de no distinguir las líneas muy próximas entre sí.

Sistema tetánico : Se aplicó igual técnica que en el sistema diftérico, pero con distintos valores de antígeno y antisuero, obteniéndose mayor número de líneas: 2 densas y 4 más débiles. (Fig. 9)



Fig. 9

La interpretación del desarrollo y significado de la reacción se efectuará al tratar el método en placa.

Tanto en uno como en otro sistema de reacción, los resultados contrastan evidentemente, en lo que a número de líneas se refiere, con los obtenidos por otros autores. Por ejemplo, Pope y colaboradores (1951), al desarrollar un sistema antígeno- anticuerpo diftérico en gel de gelatina, alcanzaron a distinguir hasta 24 antígenos (líneas)

Estas diferencias nos indujeron a tratar de indagar la razón de resultados tan dispares, pero dadas las dificultades de interpretación de las líneas en las reacciones en tubo, sumadas a la falta de equipo fotográfico adecuado para obtener un buen registro, hicieron derivar las investigaciones hacia procedimientos que se mostraran más

dóciles en nuestras manos. Por lo tanto, se abandonó el método en tubo, aunque reconociendo su ventaja respecto a sensibilidad.

Es así como se recurrió al uso de otros elementos que facilitarían el desarrollo o interpretación de las reacciones de difusión.

Se contó para ello con algunas cubetas de vidrio de caras paralelas; pero por ser insuficientes y no pudiendo disponer de otras, se improvisó una serie, preparada con portaobjetos. Las experiencias se efectuaron siguiendo el orden indicado a continuación.

ENSAYOS EN CUBETAS DE CARAS PARALELAS

Se usaron de dos tamaños: una de 35x55 mm. y 5 mm. de espesor y la otra de 21x80 mm. e igual espesor.

La técnica y los reactivos fueron los mismos que para los ensayos en tubo, insistiéndose con el sistema tetánico por la complejidad de las líneas obtenidas.

Si bien pudo hacerse en esta ocasión el registro fotográfico, se presentaron algunas dificultades, pues la desecación del gel, a pesar de la incubación en ambiente húmedo, impidió en ciertos casos la formación de líneas.



Fig 10

El empleo de inmunosuero y toxoide tetánico purificado (I-3 y II-3), mezclados en iguales proporciones al gel de agar-gelatina (exceso de anticuerpos), permitió la observación de 6 líneas de distinta densidad, tal como se aprecia en la figura 10 y cuya interpretación se hará más adelante.

ENSAYOS EN CUBETAS PREPARADAS CON PORTAOBJETOS

Ante la imposibilidad de contar con mayor número de cubetas, se decidió la preparación de otras. Se emplearon soportes de tres tipos para los portaobjetos :

a) alambres de bronce en forma de U; b) listones de madera barnizada después de haber permanecido en estufa, a 37°C., durante dos días y c) moldes de caucho.

Sobre dichos soportes se adaptaron dos portaobjetos colocados paralelamente y unidos con mástic. La distancia entre ambos fué de 4 mm. aproximadamente.

Después de algunos ensayos, fué necesario desistir del uso de estas cubetas, ya que se presentaron inconvenientes : escasa definición e irregularidad en las líneas, desecación del gel, separación del soporte, etc., difíciles de subsanar, a pesar de las modificaciones que se introdujeron.

METODO EN PLACAS

ENSAYOS EN PLACAS DE PETRI

Al comienzo de estas experiencias, no se contó con los antecedentes de Ouchterlony (1948). Inspirándonos en los métodos de medición de antibióticos para la aplicación de los reactivos, se usaron tres dispositivos diferentes: discos de papel de filtro, cilindros de pasta de papel de filtro y dedales de vidrio.

Los discos presentaron la desventaja de su escaso poder de impregnación; los cilindros de pasta de papel, si bien absorbieron mayor volumen, tuvieron la dificultad de producir corrimiento de líquido.

En cambio los dedales de vidrio, aplicados a la superficie del gel, permitieron medir exactamente con pipeta los volúmenes de líquido necesarios, con la consiguiente ventaja.

Como método de colocación se usó la técnica de Abraham y colaboradores (1941), para medir penicilina, que consiste en aplicar los cilindros en caliente sobre el gel ya preparado.

Los resultados obtenidos, aunque muy buenos, fracasaron en varias oportunidades, por corrimiento del líquido entre el vidrio y el agar, por lo que se recurrió a algunos artificios para evitar dicho inconveniente:

- 1) Impregnación previa del cilindro en agar fundido como medio de adhesión a la superficie.

- 2) Extensión del agar en dos capas superpuestas.

Como este segundo procedimiento fué adoptado definitivamente, será tratado con mayor detalle.

Se usaron placas de Petri de 10x1.5 cm., colocándose los dedales apoyados sobre una primera capa solidificada, determinándose las condiciones más convenientes como sigue:

En tres placas se vertieron, en cada una, 5, 10 y 15 ml de agar o mezcla de agar-gelatina 1%, fundidos y llevados a 50°C.. Se dejó enfriar y sobre la superficie se dispusieron los cilindros. Luego se vertió otra capa del mismo gel fundido, de 15, 10 y 5 ml., en forma

de completar un volumen de 20 ml. por placa. Así quedaron los cilindros perfectamente fijados. Después de enfriar, agregar los reactivos e incubar, se compararon las tres condiciones, observándose mayor velocidad de difusión y mejor desarrollo en la tercera placa (15 y 5 ml)

La distancia uniforme entre los dedales se puede conseguir en forma sencilla, colocando un papel con trazado de círculos debajo de la placa, o bien con un dispositivo de metal como el empleado por nosotros, que por simple apoyo sobre la superficie permite la impresión deseada.

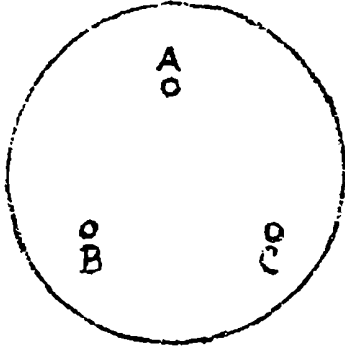


Fig. 11

El tamaño de los cilindros fué de 12 mm. de altura por 7.5 mm. de diámetro y de 10x5 mm.; su disposición, según los vértices de un triángulo, como indica la figura 11, siendo la distancia de

20 a 22 mm. de acuerdo a los cilindros usados, aunque en los trabajos preliminares fué mayor. Los cilindros se llenaron con los líquidos a ensayar, teniendo en cuenta las concentraciones necesarias para cada experiencia.

Las placas se mantuvieron en estufa a 37°C, en ambiente húmedo para evitar la desecación del gel.

Las experiencias fueron hechas por duplicado, de manera de usar una para observación diaria, reservándose la otra sin variaciones de temperatura, para el registro fotográfico.

El tiempo de reacción fué distinto para cada sistema analizado. Si bien, al describir la técnica de difusión en tubo se mencionó la actividad de la gelatina, fué con este procedimiento en placa donde se apreció aun más su utilidad, al incorporarla al gel de agar en concentración del 1%: además de producir mayor transparencia del medio, acelera la difusión y permite en algunos casos, la lectura de líneas correspondientes a componentes adicionales, que no son detectados en el gel simple.

Variante del método en placa

Cualquiera que sea la técnica utilizada, el método de reacción en placas de agar tiene el inconveniente de exigir cierta concentración de reactivos que no siempre es fácil de conseguir. Para obviar esta dificultad, se recurrió a una serie de artificios técnicos.

En el método indicado, el reactivo difunde en el medio, en redor del punto donde es colocado, aunque sólo se utiliza una pequeña zona para la reacción. Esto significa en realidad una dilución que puede evitarse.

Se efectuaron los siguientes ensayos:

a) En portaobjetos

Si en un portaobjeto cubierto de agar, se cargan, según la distancia requerida para la reacción, dos de sus bordes con los reactivos, (Fig 12), la difusión sólo se produce sobre el frente de reacción, exigiendo menor cantidad de material.

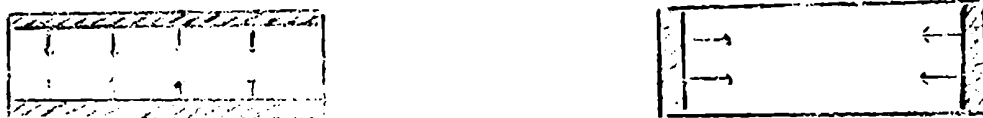


Fig. 12

b) Ensayos sobre triángulos de vidrio

Si se observa como difunde el reactivo, partiendo del centro de dispersión, según indican las flechas en la figura 13, se llega a la conclusión de que la zona útil es la limitada por la línea de puntos.

Con la base de esta deducción se cortaron triángulos de vidrio del tamaño del área marcada, que al cubrirlos con agar, delimitaban la superficie de gel a lo estrictamente necesario, reduciéndose a la sexta parte la cantidad de reactivos necesaria para obtener una reacción.

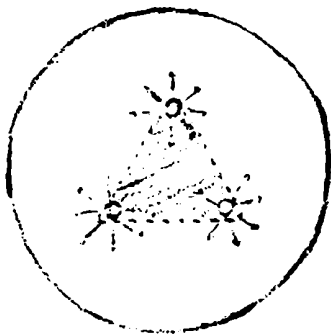


Fig. 13

En la copia fotográfica adjunta (Fig. 14), puede observarse el espectro obtenido en esta forma, usando sistema tetánico.

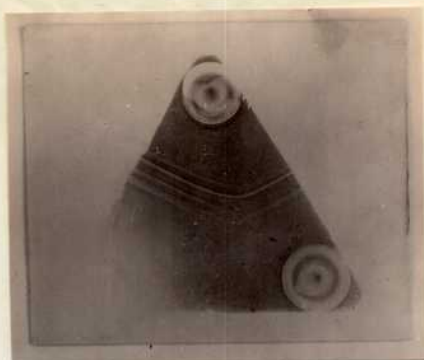


Fig. 14

Estos dos procedimientos, aunque presentaron las ventajas señaladas, tienen el inconveniente de ser muy sensibles a la desecación, por lo cual no se insistió en su uso, continuando los ensayos con el método en placa ya descrito.

Puede afirmarse, en términos generales, que con la disposición triangular de los cilindros antes mencionada, al difundir dos antígenos idénticos por un lado y su correspondiente anticuerpo por el otro, se formarán al encontrarse y estando en concentraciones óptimas (equivalencia), líneas de precipitado blancas, específicas y bien definidas.

Al prolongarse la difusión, estas líneas se unen, dando arcos de simetría. Si se trata de varios sistemas involucrados, la forma, posición y ángulo de cada línea dependerá de la concentración e identidad de los reactivos.

Una muy pequeña concentración en uno de los dedales, producirá desviación de la línea de interferencia en el lado opuesto, desapareciendo la simetría. En cambio, las líneas correspondientes a sistemas no idénticos cruzarán sin interferencia. Esto se ilustra en la figura 15.

Las sucesivas experiencias permitirán aclarar dichos conceptos.

Con el método en placa se examinaron tres sistemas antigénicos: diftérico, tetánico y estafilocócico.

Fueron numerosas las pruebas preliminares efectuadas, que permitieron seleccionar las más demostrativas. Estas se describirán a continuación.

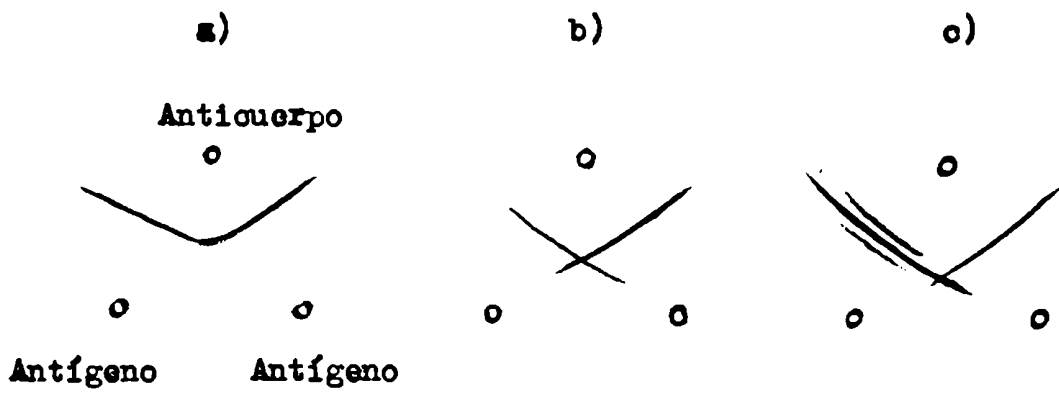


Fig. 15

En a) Antígenos idénticos en igual concentración.

En b) Antígenos no idénticos.

En c) Identidad parcial.

La denominación de los antígenos, sueros y medios de difusión, corresponde a la indicada en el capítulo relativo a materiales empleados.



SISTEMAS DE REACCION ENSAYADOS

SISTEMA DIFTERICO:

Experiencia 1

- a) Toxoide crudo, concentrado por sulfato de amonio (I-2c), en By C contra inmunosuero (II-1), de concentración equivalente, 200 Lf. en A.

Dos días después de incubarse las placas, apareció entre el cilindro del suero y los del antígeno, una línea de precipitado bien definida (I), cuya posición no varió durante los ocho días de observación. Al cuarto y quinto día respectivamente, se observaron 3 líneas más, de menor nitidez: una dirigida hacia el cilindro conteniendo el antígeno, la número II y 2 próximas III y IV, de menor intensidad y algo difusas, del lado del suero.

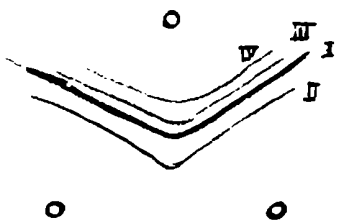


Fig. 16

Estas líneas se extendieron gradualmente hasta fundirse con las correspondientes a la reacción del lado opuesto, formando arcos concéntricos y simétricos en el punto de unión.

Por dificultades técnicas no pudo obtenerse el registro fotográfico de este ensayo.

Experiencia 2

Preparaciones antigénicas diferentes, contra el mismo inmunosuero

- a) Toxoide crudo concentrado (I-2c) en B, comparado con toxoide purificado (I-1b); suero (II-1) de concentración equivalente, 300 Lf en A.

En esta prueba, no apareció la línea III entre el toxoide purificado y suero. La línea principal I, se unió simétricamente a la correspondiente del otro lado, no así la línea II secundaria, cuya posición ha variado. Esto explicaría que durante el proceso de refinación

desaparece un componente y se modifica la concentración de otro. En cambio, el antígeno principal se mantiene invariable.

La zona clara que rodea al cilindro que contiene el toxoide concentrado crudo, según puede observarse en la foto 2a), se debe a la presencia de porfirinas y otros pigmentos que han precipitado juntamente con el toxoide.

b) Los mismos reactivos que en a) en concentración equivalente menor 180 Lf. en cada cilindro.

El gel se preparó con agar purificado con Cloruro de calcio. Se formaron las mismas líneas que en la reacción anterior, pero las secundarias fueron menos nítidas, posiblemente debido a la diferencia del medio usado.

Experiencia 3

a) Toxoide concentrado crudo (I-2c), contra inmunosuero (II-1), en concentraciones diferentes. 300 Lf en A, 300 y 200 Lf en C y B.

Las líneas de precipitado aparecieron al mismo tiempo a ambos lados: la principal, entre el toxoide y suero de distinto valor, casi no modificó su posición, siendo prácticamente constante el ángulo formado. Las líneas II, III y IV, que aparecen invertidas respecto a las experiencias anteriores, debido al cambio de disposición de los reactivos, (toxoides en A), sufrieron un ligero desplazamiento, tanto del ángulo como de posición, correspondiente a la variación de concentración, moderada en este caso.

Aunque en la foto (3a), la visibilidad de las líneas III y IV es escasa en la zona de la derecha, el examen directo de la placa no ofreció dificultad de interpretación.

Experiencia 4

a) Toxoide purificado (I-1b) de diferente concentración, 60 Lf en B y 240 Lf en C, contra el mismo inmunosuero (II-1), 200 Lf en A

En esta prueba, la línea de precipitación I, entre el antígeno y anticuerpo de gran diferencia de concentración, apareció después del segundo día. Al principio fué limitada y estrecha, aunque menos intensa que la correspondiente del lado opuesto, pero luego migró hacia el antígeno, haciéndose más ancha y difusa. Cuando se interrumpió la experiencia después de trece días, la línea II del mismo lado, se había desdoblado dando el característico "splitting", mencionado por Oakley (1953).

Estos hechos pueden explicarse, porque al haber un exceso de reactivo, el anticuerpo en este caso, por difusión continua (mayor velocidad), produce la disolución sucesiva del complejo precipitado y su posterior formación, más adelante, comprobándose que la posición de las líneas depende de las concentraciones de los reactivos, tal como ya se señalara.

En cambio, una diferencia moderada (zona opuesta), apenas modifica el aspecto de las líneas,

b) Efecto del recargado del cilindro de suero

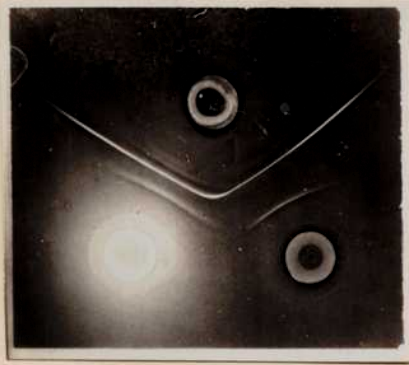
Toxide purificado (I-1b), 200 Lf en A, contra inmunosuero de valor equivalente (II-1), 200 Lf en B y C.

La experiencia se llevó a cabo en iguales condiciones que las anteriores. Pero al séptimo día, se volvió a llenar el cilindro B con el mismo volumen de suero e incubó. Después de cuatro días, se observó el ensanchamiento de la línea I y su ulterior separación (foto 4b)I); ésta se hizo más notoria al término de la prueba (10 días)(foto 4b)II). La línea II también sufrió igual modificación, como se aprecia en la foto.

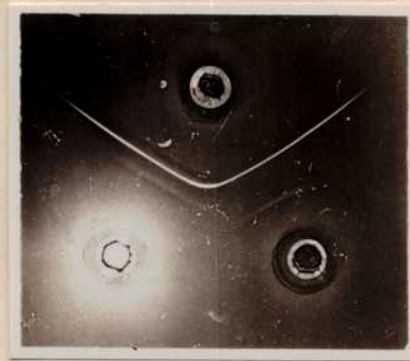
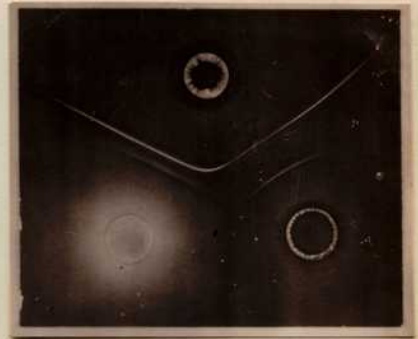
Estos resultados confirman la explicación dada en el ensayo anterior.

Como consecuencia puede deducirse la inconveniencia del agregado de reactivos después de iniciada la reacción, aun haciéndolo en todos los cilindros.

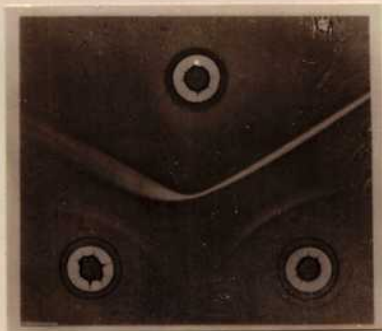
SISTEMA DIFTERICO



Experiencia 2a



Experiencia 2b



Experiencia 4a



Experiencia 5a

Experiencia 5

- a) Toxoides purificados (I-1b), en C y el mismo toxoides previamente calentado a 80°C, durante 15 minutos, en B, contra suero (II-1) en A.

Según puede observarse en la foto correspondiente (5a), el tratamiento a que fué sometido el toxoides no destruyó el antígeno principal. Si bien se produjo interferencia entre ambas líneas, la que corresponde al toxoides calentado es más difusa y no muestra simetría lo cual indicaría desnaturalización.

Experiencia 6

- a) Ensayos comparativos entre sueros diferentes

- a) Suero de procedencia norteamericana (II-2) en B y suero argentino (II-1) en C, contra toxoides purificados de concentración equivalente (I-1b) en A, 200 Lf.

Al segundo día de incubación, se formó la línea I, principal, en cada lado de los cilindros de suero, que se unió en forma simétrica posteriormente, lo mismo que la línea II. La línea III sólo apareció entre el toxoides e inmosuero argentino, sin mostrar interferencia. Las líneas II y III no se perciben bien en el registro fotográfico.

- b) Los mismos sueros (II-2 y II-1) y disposición contra toxoides crudo concentrado con sulfato de amonio (I-2c), de concentración equivalente, 600 Lf.

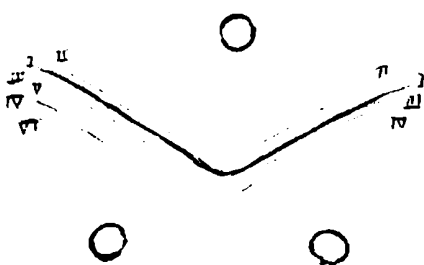


Fig. 17

En la zona correspondiente al suero norteamericano aparecieron dos nuevas líneas de precipitación: V y VI, ésta última muy tenue, que no se observaron con nuestro suero. La línea II se formó muy cerca de la I. Las restantes, I, II y IV, mostraron interferencia con

las del suero argentino.

Estas experiencias comparativas entre los dos sueros, indican di-

ferencias en cantidad de elementos en reacción, cuyas resultantes se analizarán más tarde, al tratar en conjunto las conclusiones generales.

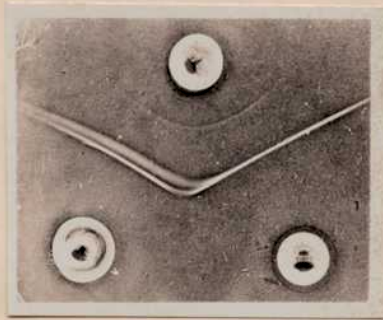
c) Los mismos reactivos que en b), en concentración equivalente menor

Después de ocho días de incubación, la línea principal presentó igual nitidez y simetría. No apareció la línea IV y las restantes mostraron menor intensidad,

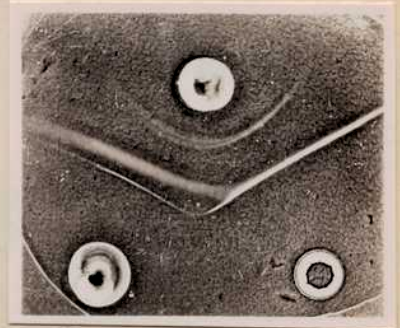
Es decir, que al disminuir el valor de los reactivos empleados algunos componentes presentes en menor concentración, no alcanzarían a sobrepasar el valor crítico o umbral necesario para la producción del precipitado, dando así un espectro de líneas reducido.

Con respecto a la línea predominante, la constancia en la posición y ángulo de simetría, la nitidez e influencia escasa que la variación de concentración de las sustancias reactivas tienen sobre la línea de precipitado, revela la similitud específica del reactivo principal en los dos sueros.

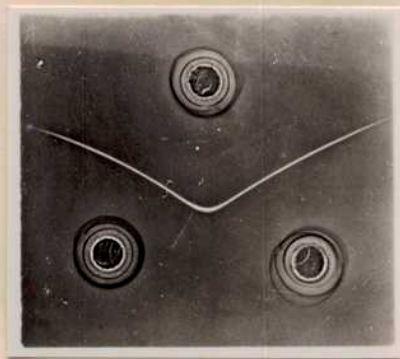
SISTEMA DIFTERICO



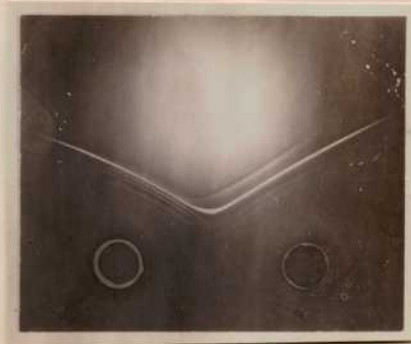
Experiencia 4b I



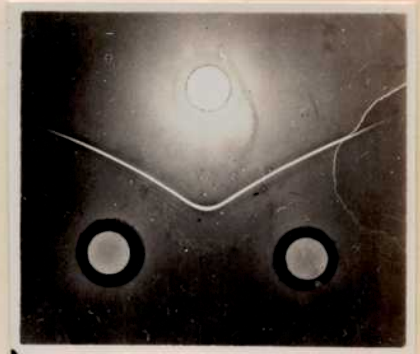
Experiencia 4b II



Experiencia 6a



Experiencia 6b



Experiencia 6c

SISTEMA ESTAFILOCOCCICO :

En las experiencias realizadas con toxinas y toxoides estafilocócicos no se ha podido llegar a una interpretación concluyente, debido a que fué imposible contar con dichos reactivos después de efectuados los ensayos preliminares. Es por ello que sólo se describen algunos, cuyos registros fotográficos no figuran por ser de escasa nitidez. Si bien estas experiencias no aportan datos completos, son de utilidad informativa.

Experiencia 1

- a) Toxina (I-9), 10U en B y toxoides correspondiente (I-10) en C, contra inmunosuero (II-5), 10 U en A.

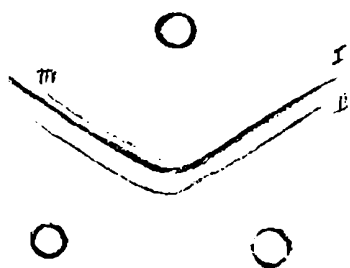


Fig. 18

Después de cuatro días de incubación aparecieron dos líneas débiles en ambas zonas, que se fueron intensificando hasta unirse en forma casi simétrica. Las líneas correspondientes a la región de la toxina fueron más densas y una tercer línea, la III, muy tenue, se formó sobre la I, entre la toxina y el suero. La reacción se interrumpió luego de veinte días.

- b) Los mismos reactivos, en mayor concentración.

Se formaron las mismas líneas pero más nítidas.

Experiencia 2

- a) Toxina (I-9) en B y toxina precipitada y dializada (I-11) en C contra inmunosuero (II-5) en A, de concentración equivalente.

Se observó el mismo tipo de reacción en ambas zonas.

Las resultantes del tratamiento de purificación (precipitación con sulfato de amonio y diálisis) sobre la toxina, no evidenciaron diferencias apreciables con el método de difusión empleado.

Como no es posible obtener conclusiones con tan escasas experiencias, se resta importancia por el momento, a la observación de una

SISTEMA TETÁNICO :

Las experiencias efectuadas con toxinas y toxoides tetánicos han sido de interés para la mejor interpretación de lo observado en el sistema diftérico, especialmente en lo que se refiere al efecto posterior de los reactivos sobre la línea de precipitación.

Como se hiciera al describir los ensayos anteriores, sólo se toman en cuenta los que tienen evidente significado para la exposición. En esta forma, al simplificar, se dejan de lado algunas experiencias negativas y las que no aportan datos nuevos, evitando repeticiones y manteniendo la unidad de presentación.

Entre estos últimos ensayos, pueden mencionarse los realizados comparativamente con la toxina tetánica, que produjo una reacción muy débil y por lo tanto de escasa significación.

Experiencia 1

- a) Toxoides purificados (I-3), en concentraciones diferentes, 25 U en el cilindro C y 7U en B, contra el suero (II-3), 25U en A.
Placas con gel de agar 1%.

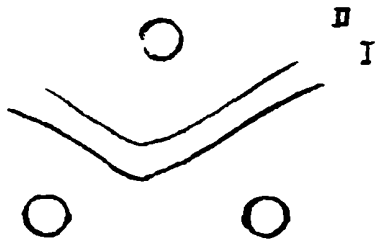


Fig. 19

Después del segundo día de reacción, comenzó a observarse la formación de 2 líneas muy tenues, entre el toxoide y suero, en ambas zonas. Estas líneas se extendieron gradualmente, haciéndose más nítidas y se unieron, dando un ángulo fuera de la región del eje de simetría.

Además, la intensidad no fué la misma, correspondiendo el máximo de precipitado a la zona de concentración equivalente. La experiencia se prolongó hasta veinte días, mostrando la presencia de 2 antígenos en el material analizado. (foto 1a).

- b) Toxoides purificados (I-4), en concentraciones diferentes: 7.5 U en B y 30 U en C, contra suero (II-4), 30 U en A.

Placas con agar-gelatina 1%.

Con este toxoide, la reacción se produjo en forma más clara y nítida que en la prueba anterior. Las líneas correspondientes a la zona de menor concentración, se desplazaron hacia el cilindro de suero sin presentar simetría respecto a las del lado opuesto. Sólo se notaron 2 líneas. (foto 1b).

Experiencia 2

- a) Toxoides purificados (I-3), de igual concentración: 10U en B y C, contra suero de alto valor (II-3), 675 U en A.

Placas con agar-gelatina.

Por ser la primera en aparecer y la de más intensa reacción, se debe homologar la segunda línea a partir del cilindro de suero, la número I de las pruebas anteriores. Próxima a ella, en la parte superior de la figura 20, se reconoce otra, perfectamente diferenciable; ésta se interpreta como correspondiente a la número II, que por exceso de suero, ha estrechado la distancia que la separa de la línea I, fenómeno ya estudiado por Oudin.

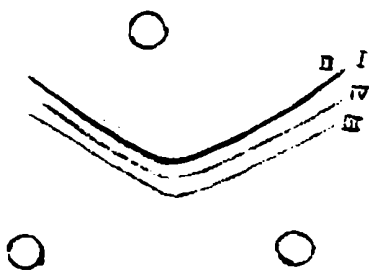


Fig 20

Por debajo de la línea I, se observan 2 líneas más, designadas IV y III, siendo la IV poco visible en la copia fotográfica (2a).

Por debajo de la línea I, se observan 2 líneas más, designadas IV y III, siendo la IV poco visible en la copia fotográfica (2a).

- b) Suero (II-3), en distintas concentraciones: 675 U en B y 7 U en C contra toxoides purificados (I-3), 10 U en A.

Placas con gel de agar 1%.

En esta experiencia, el orden de las líneas aparece invertido, por haberse modificado la colocación de los reactivos; los sueros se encuentran en la parte inferior.

En un comienzo (sexto día), las líneas I y II se produjeron casi al mismo tiempo en ambas zonas, aunque apenas perceptibles las correspondientes al suero diluído. Al final de la reacción (20 días), la relación e interferencia entre los dos sistemas desapareció casi completamente, quedando como "barridas" las líneas de la zona de menor concentración, cuya acción sobre el sistema preponderante se reduce a una ligera incurvación de la línea I y a otra, más acentuada, sobre la II. Esto fué interpretado como una consecuencia de la gran diferencia en la concentración de suero en los cilindros B y C.(2b)

Experiencia 3

- a) Toxide purificado (I-3), de igual concentración: 10 U en B y C contra inmunosuero diluído 1/10 (II-3), 67 U en A.

Placas con agar 1%

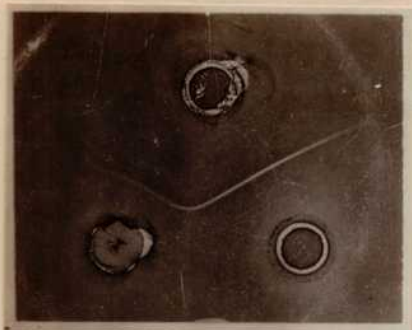
Por defecto en la colocación de los cilindros B y C, hubo que recargarlos con toxide al quinto día. La copia fotográfica (3a), fué tomada al undécimo día. En ella se observa un apreciable aumento en el número de líneas desarrolladas, de difícil interpretación en ese momento, por lo que se resolvió complementar la observación con las experiencias siguientes.

- b) Toxide purificado (I-3), de igual concentración: 10 U en B y C, contra inmunosuero concentrado, (II-3), 675 U en A.

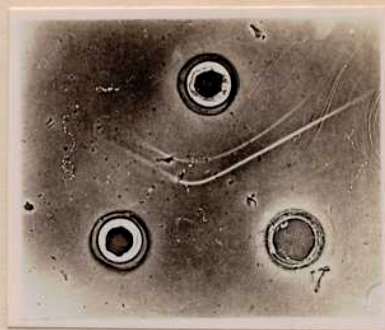
Esta experiencia fué ideada con el objeto de comprobar si se repetía el fenómeno observado en la prueba anterior, para lo cual se recargaron los cilindros de toxide al quinto día de iniciada la reacción, frente a una dosis de suero diez veces mayor que en a).

Comparado el espectro formado, con el del ensayo anterior, se ve que es de estructura semejante, con mayor número de líneas y más nitidez.(foto 3b).

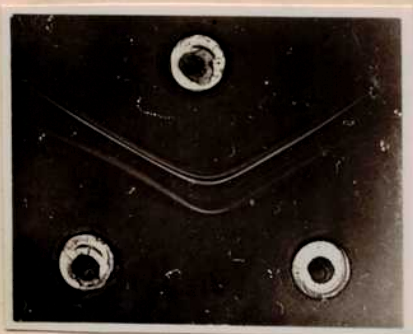
SISTEMA TETANICO



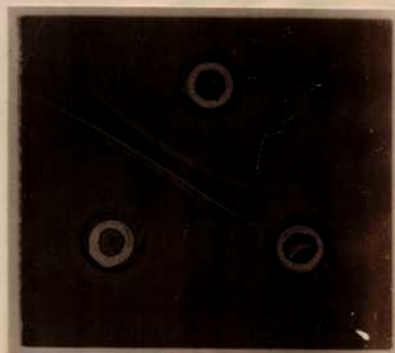
Experiencia 1a



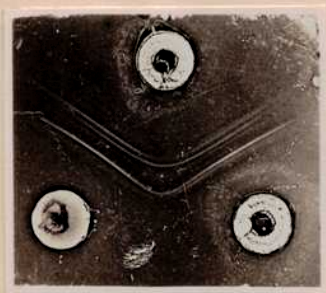
Experiencia 1b



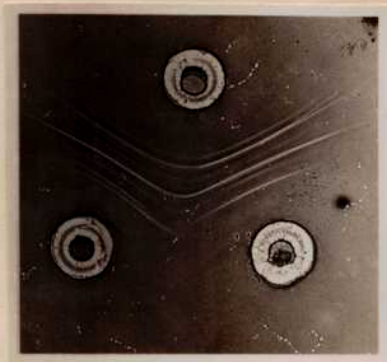
Experiencia 2a



Experiencia 2b



Exp. 3a



Experiencia 3b

Experiencia 4

Efecto del recargado sucesivo en uno de los cilindros

- a) Toxoides purificados (I-3), 10 U en B y C, contra suero (II-3), 675U en A.

Al realizar esta experiencia, se trató de mantener las condiciones constantes, menos la del sobrecargado, con el fin de efectuar una observación comparativa en la misma placa. Así, en la zona de la izquierda, se hizo la reacción normal con 10 unidades de toxoide y exceso de suero. Al séptimo día, se volvió a cargar el cilindro C con otras 10 unidades de toxoide. El registro fotográfico (3c,I), permite comparar los dos espectros:

En la región izquierda se observa la conformación del espectro simple al lado del cual contrasta el aspecto artificioso, visiblemente, dado por el sobrecargado de la derecha.

Después de obtener dicha copia fotográfica, se llenó nuevamente el cilindro C con toxoide y 5 días más tarde se efectuó otro registro (3c,II), en el que puede apreciarse un aumento del número de líneas.

- b) Toxoides purificados (I-3), 40 U en B y C, contra suero (II-3), 2700 U en A.

Para reforzar la observación, se usó mayor cantidad de reactivos en dedales de más capacidad.

Las líneas comenzaron a aparecer al sexto día. Al séptimo y décimo día se llenó nuevamente con toxoide el cilindro B, obteniéndose los registros fotográficos 6, 11 y 20 días más tarde (fotos 4b,I', II' y III').

Comparando las copias, puede apreciarse cómo permanece constante el espectro original simple. En la zona del recargado, no aumentó notablemente el número de líneas respecto al ensayo anterior, a pesar de haberse prolongado la reacción. Sólo se nota un desplazamiento ligero de algunas líneas.

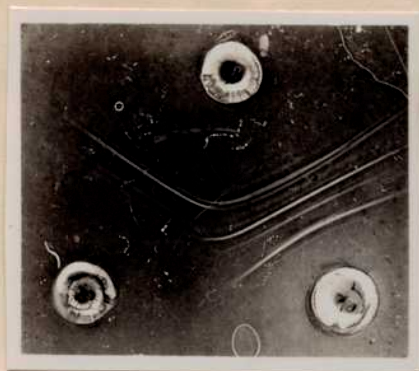
Experiencia 5

- a) Toxide purificado (I-3), 10 U en C y otro toxide purificado y precipitado por sulfato de sodio (I-6) correspondiente a 15 U en el toxide original, contra suero (II-3), 675 U en A.

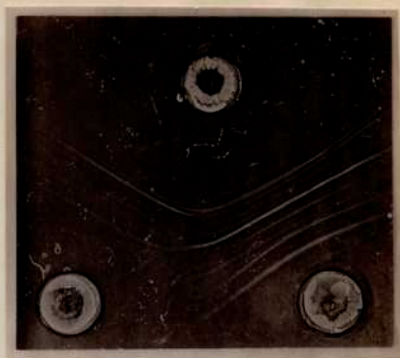
Al quinto día de incubación, se formaron 2 líneas entre el suero y el toxide simple, no observándose reacción en el lado opuesto, hasta seis días después, en que se volvieron a llenar los tres cilindros. Diez días más tarde, se interrumpió la prueba.

En el registro fotográfico, se repite lo observado en las dos experiencias anteriores, referente al efecto del recargado de los cilindros. En la zona correspondiente al toxide tratado con sulfato de sodio, se percibe el mismo espectro, aunque en forma mucho más tenue, lo que probablemente es debido a su menor concentración en unidades, como consecuencia de las pérdidas inherentes al método.

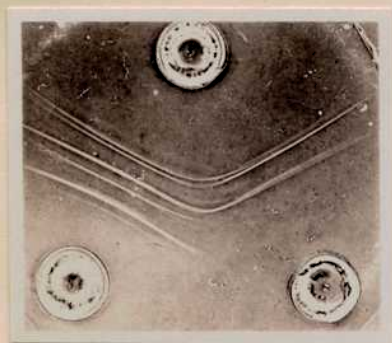
SISTEMA TETANICO



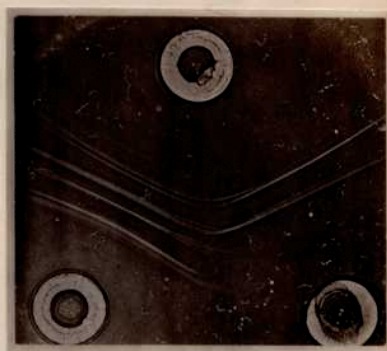
Experiencia 4a I



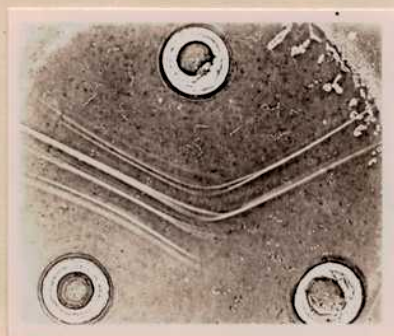
Experiencia 4a II



Experiencia 4b I'



Experiencia 4b II'



Exp, 4b III'



Experiencia 5a

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con el trabajo precedente, se ha intentado destacar la importancia que revisten para el análisis inmunológico, las técnicas de difusión en gel, ya sea para indicar el grado de pureza de un material biológico (a veces de naturaleza tan compleja, que es imposible su determinación por otros métodos, químicos o físicos), o bien para demostrar la identidad o especificidad serológica, por comparación con otras sustancias de estructura conocida.

Esto ha sido logrado a través de las observaciones efectuadas al difundir distintas preparaciones antigénicas con los inmunosueros homólogos, en medios gelificados, pues al sobrepasar los reactivos un cierto umbral de concentración, se producen precipitados definidos, poco solubles, cada uno de los cuales representa una reacción individual entre el antígeno y su correspondiente anticuerpo. Es decir, que la formación de tales precipitados no impide o molesta la difusión de cada componente no incluido en una reacción particular.

Las experiencias con los distintos sistemas ensayados, han permitido conocer los diferentes factores que intervienen en la difusión y su grado de importancia.

Es por ello que se comenzó con una reseña sobre los principales métodos empleados por varios investigadores, describiendo además sus fundamentos. Así, se compararon los ensayos en tubo y placa con variantes, indicando las ventajas e inconvenientes de cada método, para adoptar al final como definitiva, la técnica de difusión en placa.

Método en tubos y cubetas de caras paralelas:

Como ya se señalara, se introdujo una modificación ventajosa al mezclar también el antígeno con gel, siguiendo el mismo procedimiento que con el suero. Se logró evitar fácilmente, de este modo, el escurrimiento de líquido entre la pared del tubo y la columna central. Además se incorporó la gelatina a ésta última, lo que mejora la nitidez de la reacción y en algunos casos acelera la aparición de las líneas de precipitado.

Aunque la sensibilidad del método parece ser mayor que con el de

placa, las dificultades para obtener un buen registro fotográfico y la imposibilidad de comparar distintos materiales, indujeron a adoptar la técnica en plada de Petri, después de haber observado las ventajas brindadas por ésta última.

Por la misma razón, no se insistió en el uso de las cubetas de caras paralelas, dados los inconvenientes señalados en el capítulo respectivo.

Método en placas

Cubetas horizontales y placas triangulares: Los resultados obtenidos no estuvieron de acuerdo con lo que se esperaba de la aplicación de principios que parecían promisorios. Frente a la ventaja de poder utilizar menor cantidad de reactivos, por el menor efecto de dilución, se presentó la dificultad de que no resistían períodos largos de incubación. Las cámaras húmedas empleadas no fueron lo suficientemente perfectas como para impedir la evaporación, defecto agravado por las deformaciones debidas a la retracción del agar.

Placas de Petri: Fué el método usado con preferencia. Las principales ventajas halladas pueden resumirse como sigue:

La placa de Petri es un elemento habitual en los laboratorios dedicados al tema. Es de fácil esterilización y limpieza. Su manejo resulta muy simple, pues basta verter en su interior un tubo de agar fundido y dejar solidificar, para obtener una película apta para efectuar las reacciones.

El principal inconveniente reside en el cierre imperfecto, pero se corrige fácilmente, disponiendo las placas en cajas que aseguren un ambiente húmedo.

Por otra parte, el uso de los cilindros como receptáculo de los reactivos, eliminó la mezcla previa de estos con el gel. Su disposición sobre la superficie de la película, posibilita la comparación simultánea de distintos materiales.

Así se llegó a desarrollar, durante el curso de estas investiga-

ciones, una técnica cuyas ventajas decidieron su elección como método definitivo, dando por terminados los ensayos preliminares.

Sistemas de reacción ensayados:

Descartando los ensayos con toxinas estafilocócicas, por su escaso número y tomando en conjunto los resultados obtenidos con las reacciones en gel de los sistemas diftéricos y tetánicos, puede decirse:

Las conclusiones a las que se arribó, concuerdan con las de otros autores en lo referente a su extraordinaria utilidad como método de análisis antigénico.

Aunque el número de líneas observado está sujeto a artificios de técnica, una cuidadosa y prudente interpretación, ligada a un procedimiento riguroso, permite hacer deducciones acerca de la constitución antigénica de un reactivo precipitable.

Se encontró mayor utilidad en las reacciones comparativas y aplicando los principios recomendados para el reconocimiento de antígenos comunes similares o para su diferenciación.

Para ello se practica la reacción en forma de que los frentes de precipitación se encuentren en ángulo: las reacciones comunes para el mismo antígeno, suman sus efectos en el punto de unión de las líneas correspondientes, conformando una sola línea, mientras que el floculado producido por antígenos o anticuerpos diferentes, reaccionan por separado sin interferencia de las líneas, que se cruzan.

Pero respecto de la interpretación de estos fenómenos, que Elek (1949) designó con los términos looping y overlap, cabe hacer el mismo llamado de atención ya señalado al hablar del número de líneas, pues, por artificios de técnica, también se pueden obtener aspectos que se prestan a confusión.

Las experiencias efectuadas con toxoides tetánico y diftérico ponen en evidencia lo fácil que es producir distorsiones en los resultados.

Con el objeto de indagar si en nuestras toxinas había más reactivos que los acusados por las dos líneas desarrolladas en los ensayos, aproximadamente equivalentes sus proporciones, y considerando los consejos de Oudin (1948), se utilizó un procedimiento similar.

Dicho autor recomienda poner en exceso la sustancia reactiva del lado de la zona que se desea analizar más minuciosamente. En esta forma consigue un aumento en el número de líneas observadas, con su técnica en tubo. Para obtener este efecto, se recurrió primero a dedales de mayor capacidad, terminando por utilizar el artificio de Ouchterlony, que consistía en reforzar uno de los centros de difusión por recargado del reactivo. Así, podía aumentarse la capacidad de reacción en un sentido determinado; pero los resultados no fueron como se esperaba.

Mientras se usaron dedales de mayor tamaño y reactivos más concentrados, no se obtuvo modificación aparente del espectro, además de la intensificación del precipitado (salvo un caso especial que se tratará más adelante). Pero en cuanto se dispuso del recurso del sobrecargado, posiblemente por efecto de la alteración en el ritmo de la difusión, el aspecto de las reacciones cambió fundamentalmente. Las figuras 4b) son muy representativas de lo que ocurre en el sistema diftérico. La primera fue tomada a los 12 días de reacción, 4 después de haber recargado con suero el cilindro B. Puede notarse el efecto de este aditamento, comparándolo con el aspecto de la reacción normal, a la derecha. Se observa una segunda banda difusa que simula conformar una nueva línea, la que se unifica con las dos líneas número I, como indicando un sólo carácter antígeno. Una semana más tarde, se obtuvo la segunda copia fotográfica (4bII), notándose lo siguiente:

La línea I en la zona de la derecha, se ha intensificado (reacción normal), mientras que la correspondiente al cilindro B ha disminuído su intensidad. En tanto, la nueva línea formada se ha separado más de ella, ampliando su zona difusa de reacción, pero conservando el contacto en el ángulo con el precipitado principal.

Con lo observado, es difícil reconocer la línea difusa como demostrando la existencia de un antígeno especial, distinto del I.

Todo habla en favor de la presencia de un artificio provocado por el recargo del cilindro B, que al forzar un nuevo avance de reactivo (suero), ha producido un arrastre por solubilización parcial del pri-

mer precipitado, como lo evidencia la disminución de la densidad de la línea I primitiva.

Las experiencias efectuadas con toxoide tetánico purificado, que parecen diferir fundamentalmente de los ensayos anteriores, significan posiblemente un aporte a su mejor comprensión.

En el primer ensayo 3a), se recargaron los cilindros de toxoide al 5° día y la copia fotográfica tomada al 11° día, revela un cambio en el espectro habitual en tétano, que consta de dos líneas principales. El número de líneas ha aumentado, lo que se demuestra con mayor evidencia en la experiencia 3b), similar a la anterior, pero empleando una mayor cantidad de anticuerpos.

El ensayo 4b) se hizo recargando uno solo de los cilindros (como en el sistema diftérico), para facilitar la observación comparativa. El registro 4a)I, que fue obtenido después de llenar nuevamente el dedal C, permite apreciar la diferencia con una reacción normal y en las mismas condiciones experimentales, salvo la variante indicada (re cargado). Es apreciable la multiplicación del número de líneas, que se hace más evidente en la copia 4a) II, obtenida después de reaccionar con un tercer agregado de toxoide.

En la experiencia posterior 4b), se siguió una norma semejante, con la diferencia de utilizar mayor cantidad de reactivos. En los días 7° y 10°, se recargó el cilindro B y los registros fotográficos fueron tomados 6, 11 y 20 días después del último agregado. Es reacción en esta última experiencia, que se encuentra algo que recuerda lo observado en difteria en condiciones similares. Aunque mucho más tenuemente que en difteria, se nota una difusión de la línea correspondiente (por posición), a la segunda principal del espectro normal, que se despliega en dos en el ángulo, como significando su tendencia a desdoblarse.

Lo observado en los sistemas diftérico y tetánico, puede interpretarse como manifestación de un mismo fenómeno, que modifica su aspecto posiblemente por cualidades diferentes del precipitado formado. El diftérico parece ser relativamente fácil de solubilizar o de ser suspendido en exceso de toxoide y el nuevo complejo sería incapaz de

dar líneas bien distintas y como consecuencia, produciría zonas difusas.

El complejo tetánico parece ser mucho más resistente a la resolución o arrastre por exceso de reactivo. El suero en exceso podría sobrepasar la zona de reacción, una vez agotado el antígeno. Así, al sobrecargar con toxoide uno de los dedales, se lo obliga a actuar como si el centro de difusión del anticuerpo estuviese más próximo. Vale decir que el frente de contacto entre los reactivos, puede no concordar con el primitivo, siendo posible la repetición de los espectros.

Es así como, con el procedimiento de sobrecargado de los cilindros, se ha podido demostrar la posibilidad de crear espectros artificiales.

Podría suponerse que en la práctica esto no ocurriría empleando las técnicas comunes. Pero en la copia fotográfica 4a), puede observarse que por simple exceso de un reactivo, se ha producido una difusión de la línea principal, que en algunos puntos parece tener tendencia a desdoblarse y sin haber mediado el artificio del recargado.

Ya Oudin habló de distorsiones de los resultados por defectos de constancia en la temperatura.

En el caso de la figura correspondiente a 4a), se tuvo el cuidado habitual de mantener una misma temperatura durante toda la prueba, de manera de no poder considerarla como causa del fenómeno.

Cuando se observan algunos resultados publicados con gran número de líneas obtenidas con reactivos considerados como relativamente simples, cabe preguntar hasta donde el artificio de técnica, cuyas causales algunas se conocen y otras no, pudo haber intervenido, desvirtuando los resultados.

Pope y colaboradores (1951), en un magnífico trabajo sobre purificación de toxina y toxoide diftérico, hacen ensayos de precipitación en gel y observan hasta 24 líneas desarrolladas en reacción en tubo con antígenos muy concentrados (1000 Lf).

Es indudable que los medios de cultivo, donde las bacterias han elaborado la toxina, pueden contener, además de ella, otros elementos

antigénicos, entre los que se encuentran los productos de desintegración del cuerpo bacteriano. Lógico es esperar que tengan su representación en las reacciones en gel, con toxinas que no han sufrido un proceso de purificación suficiente.

Pero es difícil comprender la existencia de 24 antígenos separables por difusión, cuando con las demás técnicas conocidas, sólo pueden diferenciarse unos pocos, aunque por procesos de purificación llegan a obtener un antígeno que sólo produce 3 líneas y un suero que desarrolla una sola.

En el curso de estas investigaciones se tuvo muy en cuenta las observaciones efectuadas por Pope y colaboradores, en razón de las diferencias en los resultados, pues el espectro fundamental obtenido fue siempre muy reducido.

Ante el conocimiento de que los sueros del Instituto Malbrán utilizados, fueron preparados con toxoides purificados por precipitación en punto isoelectrico, se trató de indagar más, dado que ello podía tener influencia en los resultados.

Por tal razón, se han ideado las experiencias 6a) y 6b). En la primera se usó un suero terapéutico proteolizado de procedencia norteamericana, al mismo tiempo que nuestro suero, frente a toxoide purificado. En síntesis, la reacción fue similar con ambos sueros, salvo pequeñas diferencias ya comentadas. En cambio, en la experiencia 6b), se observan diferencias notables al poner los mismos sueros frente a un antígeno de escasa purificación: un toxoide crudo precipitado por sulfato de amonio a saturación y posteriormente dializado.

Analizando la foto correspondiente (6b), se encuentra un desequilibrio evidente en redor de la línea principal. El suero argentino (S.A.), muestra su línea próxima al toxoide mucho más marcada que el norteamericano S.N. En cambio, este evidencia del lado contrario un número mayor de líneas que S.A.

Esto, que anteriormente fue expresado como desequilibrio de la reacción, demuestra una diferencia en el contenido de anticuerpos, que puede ser debida al proceso de inmunización o al tratamiento

previo a que fueron sometidos los antígenos usados para la obtención de los sueros.

Para recalcar la fineza de la técnica, cabe hacer otra aclaración. La figura 6b) no sólo ha mostrado diferencias entre el suero americano y el del Instituto Malbrán, sino que ha permitido apreciar una línea más en el suero argentino, que no se había observado en las reacciones con toxoides purificados.

El problema pudo ser aclarado por la información posterior de que al finalizar el proceso de inmunización, el caballo dador fue inoculado con pequeñas dosis de toxina sin purificar.

El hacer tales deducciones sólo ha sido posible por la aplicación del método de precipitación en gel, que abre nuevos puntos de mira en la observación de la combinación antígeno-anticuerpo.

Otros métodos de más engorrosa ejecución, como el análisis por absorción de anticuerpos o la precipitación específica fraccionada, no pueden dar los detalles de estructura que se evidencian tan fácilmente con el método objeto del presente estudio y que actualmente solo puede ser superado por la combinación de este mismo procedimiento con el de la separación electroforética.

RESUMEN

- 1°) Se pasa revista a los métodos conocidos para estudiar la reacción de los antígenos con sus correspondientes anticuerpos en soportes gelificados.
- 2°) Se desarrolla una técnica para ensayos de precipitación en gel.
- 3°) Aplicada al estudio de sistemas de reacción en difteria y tétano, ha permitido por un lado, demostrar la sutileza del método para observar diferencias de estructura en esos reactivos.

Por otro lado, se obtienen mediante artificios de técnica, alteraciones de los espectros de precipitación que son un llamado a la prudencia en la interpretación de los resultados.

Teresa Liguori

BIBLIOGRAFIA

Los trabajos que fueron consultados directamente, figuran con su título completo. De los restantes, citados por otros autores, sólo se menciona la revista correspondiente.

- Abraham E.P., Chain E. y colaboradores (1941). Further observations on penicilin. *Lancet*, 2, 177-189.
- Ambrose E. y Easty G. (1953). Detection of antigen-antibody interaction by an interferometric method. *Nature*, 172, 811.
- Ascoli A. y Valenti (1910). *Zeitsch. fur Infektions Kr.*, 7, 5.
- Becker E. y Muñoz J. (1949). Multiplicity of antigens in ragweed pollen extract as demonstrated by the technic of Oudin. *J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72, 287.
- Bechold H. (1905). *Z. physical Chem.* 52, 195.
- Björklund B. (1952 a). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 79, 324.
- Björklund B. (1952 b). Specific inhibition of precipitation as an aid in antigen analysis with gel diffusion method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 79, 319.
- Björklund B. (1953). *Int. Arch. Allergy, Basel*, 4, 340-379.
- Björklund B. (1954). Qualitative analysis of gel precipitates with the aid of chemical colour reactions. *Int. Arch. Allergy, Basel*, 5, 293-298.
- Carter H.S. y Wilson W. (1949). *Glasg. med. J.*, 30, 43.
- Charrin A. y Roger G. H. (1889). *C.R. Soc. Biol.*, 95, 1, 667.
- Dean H.R. y Webb R.A. (1926). The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. *J. of Path. and Bact.*, 29, 473.
- Elek S.D. (1948). The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro. *Brit. Med. J.*, 1, 493.
- Elek S. D. (1949). The serological analysis of mixed flocculating systems by means of diffusion gradients. *Brit. J. Exp. Path.* XXX, 484.
- Elek S.D. y Levy (1950). Diffusible antigens in staphylococcal cultures. *Brit. J. Exp. Path.*, XXX, 1, 358.
- Grabar Pierre (1954). Etudes sur les proteines avec l'aide des méthodes immunoquímiques. *Bull. Soc. Chimie Biolog.* 1, 65.
- Grunbaum A.S. (1896). *Lancet*, 11, 806.
- Guillaumie M., Kréguer A. y Geoffroy M. (1954). Diffusion de différentes toxines dans de sérums anti-gangréneux gélosés. *Ann. Inst. Past.*, 5, 523.
- Hanks J.H. (1935). *J. Immunol.*, 28, 95.

- Hedges E.S. (1932). Liesegang rings and other periodic structures. Chapman and Hall Ltd., London.
- Heidelberger M. (1939). Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions. *Bact. Rev.*, 3, 49.
- Heidelberger M. (1939). *Chem. Rev.*, 24, 323-343.
- Jensen K. y Francis T. (1953). Antigen-antibody precipitates in solid medium with influenza virus. *J. Immunol.*, 70, 321.
- Kraus Rudolph (1897). *Wien. klin. Wschr.*, 10, 431-736.
- Lapresle Claude (1955). Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. *Ann. Inst. Past.*, 89, 654.
- Munoz J. y Becker E. (1950). Antigen-antibody reaction in agar. *J. Immunol.*, 65, 47.
- Nicolle C. (1898). *Ann. Inst. Past.*, 12, 161.
- Nicolle C., Césari y Debains (1920). Etudes sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes. *Ann. Inst. Past.* 34, 149-596.
- Oakley G. y Fulthorpe J. (1953). Antigenic analysis by diffusion. *J. Path. Biol.*, 65, 49.
- Ouchterlony Orjan (1948). *Act. pat. micr. scand.*, 25, 18.
- Ouchterlony Orjan (1949 a). *Lancet*, 346.
- Ouchterlony Orjan (1949 b). Antigen-antibody reaction in gels. *Ark. Kemi. Miner. Geol.*, 26, B, 14.
- Ouchterlony Orjan (1949 c). *Act. path. micr. scand.*, 26, 507-516.
- Ouchterlony Orjan (1949 d). *Ark. for Kemi.* 1, 43-55.
- Ouchterlony O., Ericsson H. y Neumüller C. (1950). Immunological analysis of diphtheria antigens by the gel diffusion method. *Act. med. scand.*, 138, 76.
- Ouchterlony Orjan (1951). *Bull. Soc. Chim. Biol., Paris*, 33, 758.
- Ouchterlony Orjan (1953). Antigen-antibody in gels. IV types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Act. path. mic. scand.*, 32, 232.
- Oudin Jaques (1946). *Ann. Inst. Past.*, 222, 115.
- Oudin Jaques (1947). Annalises immunochimique de sérum de chevaux. *Bulletin Soc. Chim. Biol., Paris*, 29, 140.
- Oudin Jaques (1948). L'analyse immunochimique qualitative; méthode par diffusion des antigenes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. *Ann. Ins. Past.*, 75, 30,109.
- Oudin Jaques (1949). *Compt. rend. Acad. d. So.*, 1890-92, 228.
- Oudin Jaques (1953). L'analyse immunochimique du sérum humain et de ses fractions. *Ann. Inst. Past.*, 85, 336-348.
- Oudin Jaques (1955). L'analyse immunochimique par la méthode des gels. Moyens et techniques d'identification des antigenes. *Ann. Inst. Past.*, 89, 531.

- Petrie G.F. (1932). A specific precipitin reaction associated with the growth on agar plates of meningococcus, pneumococcus and *E. Dysenteriae* (Shiga). Brit. J. Exp. Path., 13, 380.
- Petrie G.F. y Steabban D. (1943). Specific identification of the chief pathogenic clostridia of gas gangrene. British Med. J. March 27, 377.
- Pope, Stevens, Caspary y Fenton (1951). Some new observations on diphtheria toxin and antitoxin. Brit. J. Exp. Path., 32, 3, 247.
- Rafyt A., Chamsy H. y Delsal J. (1954). Application de la méthode par diffusion d'Oudin-Oakley pour le dénombrement des antigènes tétaniques. Rev. d'Immunol., 18, 391.
- Ramon G. (1922). Comp. Rend. Soc. Biol., 86, 661.
- Ramon G. (1923). Ann. Inst. Past., 37, 1001.
- Reiner y Koep (1927). Kolloid Z., 42, 335-338.
- Rolyveld E. Turpin A. y colaboradores (1954). Purification de la toxine diphtérique. Contrôle qualitatif des fractions par la méthode de précipitation spécifique en gel. Ann. Inst. Past., 87, 3, 301.
- Sia R. y Chung F. (1932). Use of antipneumococcal types. Proc. Soc. Exp. Biol., 29, 792.
- Uhlenhuth P. (1905). Dtsch. med. Wschr, 5, 1673.
- Widal F. y Sicard M.A. (1897). Ann. Inst. Past., 11, 353.
- Widal F. (1896). Bull. Soc. Med. Hôp. Paris, 13, 35.
-