

# APORTACIONES SOBRE EL PODER ANTI- GÉNICO DE LOS MICROBIOS VIRULENTOS Y ATENUADOS

por

J. VIDAL    C. RUIZ    C. ARROYO    C. S. ENRÍQUEZ

Antes de entrar a describir y comentar los resultados de nuestras investigaciones, creemos indispensable de finir con la mayor claridad posible el significado de poder *antigénico* y poder *inmunizante*, que algunas veces se confunde en los tratados de inmunología.

En términos generales se dice que la introducción de una albúmina o de un lipóide en el seno de las células vivas provoca siempre una reacción defensiva que a veces se traduce por la presencia de anticuerpos y en ocasiones por la instalación de un estado inmunitario frente al cuerpo antígeno heterólogo. Pues bien, anticuerpo no siempre es sinónimo de estado de inmunidad, como tampoco éste lo es de anticuerpo.

Los anticuerpos, que para entendernos diremos que son las sustancias más o menos hipotéticas demostrables por las técnicas de laboratorio que descubrimos *in vitro*, existen algunas veces en organismos sensibles a la acción patógena de ciertos antígenos microbianos. Por ejemplo : un animal inoculado repetidas veces con productos tuberculosos muertos tiene en su sangre pre-

cipitinas, osoninas, aglutininas, anticuerpos de Bordet, bacteriotropinas, etc., y, en cambio, no ofrece apenas resistencia a la actividad patógena del bacilo de Koch.

Un animal inoculado con cultivos de bacilos de mal rojo no tiene apenas en su cuerpo todas estas *inas* que acabamos de enumerar y, no obstante, su sangre tiene un alto poder inmunizante, o sea, que cura, que mata *in vivo* los gérmenes de la clásica enfermedad roja del cerdo.

Parece, por tanto, que no siempre corre paralela la propiedad de formar anticuerpos demostrables *in vitro*, con la facultad de crear un estado refractario prácticamente utilizable.

Ciertamente, lo general, en gran parte de infecciones, es que la presencia de diversos anticuerpos vaya acompañada de inmunidad, y es por esta razón que se utiliza en clínica la determinación y valoración de algunos anticuerpos para fines diagnósticos o índices de inmunidad.

Pero en el lenguaje científico es preciso determinar el significado de las expresiones para no confundir los efectos. Admitidos estos razonamientos, tendremos que el poder *antigénico* es la propiedad que poseen los diversos cuerpos que conocemos con el nombre de antígenos de provocar la formación de valores reaccionales demostrables por técnicas de laboratorio. (Desviación del complemento, aglutininas, precipitinas, modificaciones hemáticas, etc.) Y el poder *inmunizante* es la propiedad que tienen algunos antígenos de crear estados refractarios frente al poder patógeno de los antígenos microbianos.

El antígeno, bacilo de mal rojo, es elemento poco apropiado como tal antígeno; pero, en cambio, es un excelente creador de inmunidad.

Hemos creído conveniente hacer estas declaraciones para que nadie entienda, al hablar de poder de formación de aglutininas de nuestros microbios de experimentación,

que queremos decir que ambos se comportan igual, en cuanto a su función inmunizadora. En nuestro caso particular es muy difícil llegar a una respuesta experimental sobre esta cuestión, por tratarse de un microbio que no se maneja muy fácilmente en estado de virulencia.

Pues bien, fundados en estos conceptos inmunológicos, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo.

Un germen virulento, ¿tiene mayor capacidad formadora de anticuerpos que un hermano suyo perfectamente atenuado?

Teniendo en cuenta que, en general, los microbios virulentos poseen mayor actividad inmunógena que los atenuados, era de interés para nosotros ver cómo se comportaba el organismo conejo frente a dos antígenos iguales, diferentes únicamente en su acción patógena.

Utilizamos para nuestros ensayos un bacilo *Mallei*, perfectamente virulento en su primer paso, en medio artificial (patata glicerizada), a partir de pus de vaginolititis del cobayo.

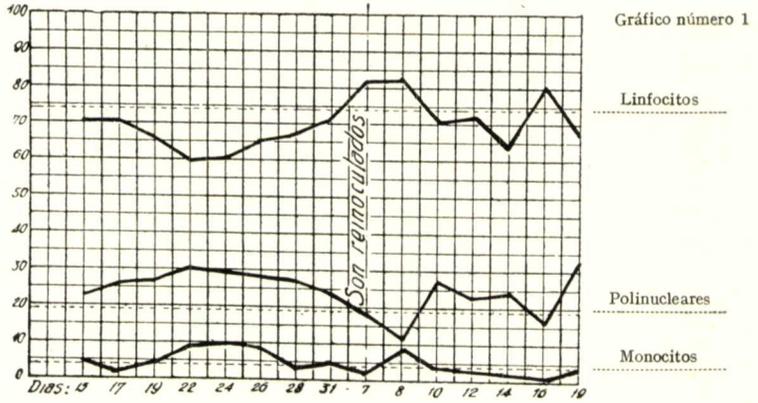
El otro microbio es un *Mallei*, absolutamente atenuado, que lleva cerca de cinco años sin pasar por ningún animal y que ha vivido dos años en medios biliados, con el propósito de atenuar definitivamente su poder patógeno.

Es el llamado *Mallei* 22, que uno de nosotros ha estudiado detenidamente, llegando a la conclusión de que ha perdido toda virulencia, aun inyectándole en el parénquima testicular.

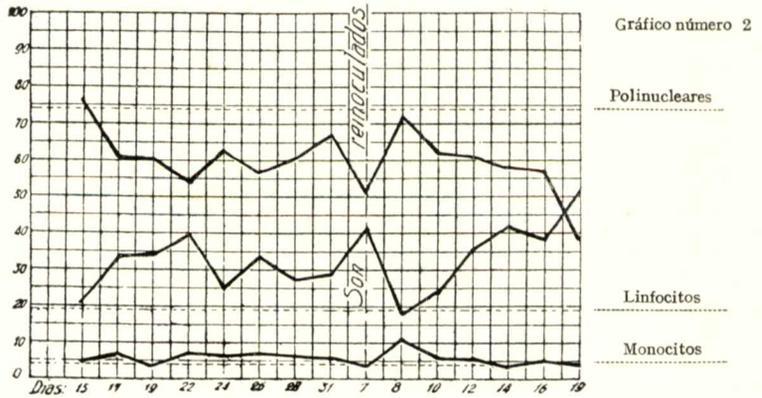
Trabajamos, pues, con dos antígenos microbianos cuyas características biológicas y morfológicas en los medios artificiales son perfectamente iguales. Su diferencia (fundamental ciertamente) radica en el poder patógeno para el cobayo y demás animales sensibles.

El medio de cultivo utilizado ha sido el mismo. El tiempo de permanencia en la estufa, idéntico; y tanto el

Fórmulas leucocitarias promedio de los conejos inoculados con *Mallei virulento*



Fórmulas leucocitarias promedio de los conejos inoculados con *Mallei avirulento* (M. 22)



líquido con que se preparó la emulsión como la concentración de la misma, sensiblemente iguales. Hemos procurado que las condiciones de nuestra experiencia sean francamente comparables en cuanto a sus resultados.

Pensamos investigar la respuesta orgánica de nuestros conejos, frente a los dos antígenos descritos, valiéndonos de la determinación de su fórmula leucocitaria y de la valoración de sus aglutininas y anticuerpos demostrables por la desviación del complemento. La única dificultad que se nos ofreció consistía en no poseer documentos ni cifras previas para determinar la fórmula leucocitaria normal de los conejos.

Nos fué preciso fijar una cifra para ver las oscilaciones que experimentaron frente a nuestras emulsiones de Mallei. Las cifras promedias de nuestras determinaciones son las siguientes:

|                    |    |
|--------------------|----|
| Linfocitos.....    | 74 |
| Polinucleares..... | 19 |
| Monocitos.....     | 4  |

Hemos despreciado las fracciones, sacrificando la precisión, para tener números redondos y por considerar suficiente la exactitud obtenida. A estos números, pues, se refiere la línea normal de las gráficas de este trabajo que indican las variaciones morfológicas de los elementos hemáticos. Es muy importante advertir que las oscilaciones de las formas hemáticas no tienen la precisión y la regularidad de otras respuestas orgánicas, como podrá comprobar quien examine atentamente los gráficos que acompañamos. Para dar a los resultados de las modificaciones hemáticas una característica aprovechable, quitándole su hermetismo individual, hemos buscado los promedios de cada día trazando con ellos las líneas de los gráficos 1 y 2.

Hasta aquí la exposición de nuestras ideas experimentales y los detalles más importantes de nuestras técnicas.

Veamos ahora los resultados obtenidos y las consecuencias que de los mismos pueden desprenderse.

#### FÓRMULA LEUCOCITARIA

Con el germen virulento hemos obtenido modificaciones clarísimas hacia un aumento de polinucleares (conejos núms. 60, 59 y 56), modificaciones discretas (núm. 51) y casi insensibles (núms. 52 y 53). Pero observando la curva de los promedios — gráfico 1 — se ve claramente que a los ocho días aparece un aumento sensible de polinucleares, que baja al reinocular la emulsión microbiana, para volver a subir a los cuatro días. Luego comentaremos esta reacción precoz.

En los conejos inoculados con Mallei 22 (germen avirulento), la reacción polinuclear se manifiesta mejor, pues excepto en los conejos 48-49, en los demás es de una alta proporción.

El mismo fenómeno se observa a la reinoculación. O sea que aparece más rápidamente la proliferación polinuclear. Este hecho creemos que tiene fácil explicación. Los polinucleares que encontramos en la sangre circulante aumentan su número cuando las necesidades locales (punto de inoculación) no exigen allí su presencia para los fines de bacteriofagia o de limpiadores de cuerpos extraños, que es preciso eliminar del seno de los tejidos. Es por este mecanismo por el que la primera inoculación demuestra sus efectos en la sangre circulante a los ocho o diez días, porque durante este tiempo se acumularon en el foco para luego reintegrarse a la circulación general. En la segunda inoculación reaccionan más rápidamente

por un proceso normal de inmunidad que supone un aprendizaje en la función leucocitaria, por el cual estos elementos se desembarazan con más facilidad y rapidez de los elementos extraños, que en este caso son los microbios inoculados. Apoya nuestra manera de ver la presencia, en algunos conejos, de polinucleares que se tiñen mal por el método de Papenheim, con vacuolas, núcleos destruidos y otras manifestaciones de muerte celular o indicios de su lucha con los gérmenes. Estas formas de destrucción sólo aparecen a los seis u ocho días, época en que toca ya a su fin la acción activa de estos elementos hemáticos.

Por lo tanto, nuestros conejos han reaccionado de una manera normal ante el antígeno de Mallei. Varios investigadores han demostrado que el microbio del muermo provoca una reacción del mismo tipo.

En cuanto a la diferencia entre los dos antígenos (virulento y avirulento) no es muy acusada, tomando como elemento comparativo las gráficas de promedios. En ambas se observa un aumento claro en el número de polinucleares. La única diferencia manifiesta se aprecia en el fenómeno de la reinoculación que en el avirulento va precedido de *shock* leucocitario o, mejor, polinuclear, y podría explicarse por la rapidez de fijación en el foco, lo cual produciría incidentalmente una baja, para luego remontarse al verse libre de su cometido local.

Sin querer dar a nuestras cifras un valor demasiado absoluto y sin entusiasrnos con la claridad de la gráfica núm. 1, pensamos se puede admitir que ambos antígenos provocan una reacción igual que tiende a un aumento claro del número de polinucleares. La atenuación de nuestro Mallei 22 no ha modificado la propiedad intrínseca del bacilo del muermo de producir su reacción característica sobre la fórmula leucocitaria.

VARIACIONES OBSERVADAS EN  
LA FÓRMULA LEUCOCITARIA

*Conejos inoculados de primera intención et*

| Conejo número | Fecha de la toma de sangre | Linfo-citos | Micro-citos | Mono-citos | Índice de Arneth |              |              |              |              |
|---------------|----------------------------|-------------|-------------|------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                            |             |             |            | De 1 núcleo      | De 2 núcleos | De 3 núcleos | De 4 núcleos | De 5 núcleos |
| 47            | 15-VIII-32                 | 82          | —           | 4          | —                | 2            | 4            | 8            | —            |
|               | 22-VIII-32                 | 50          | 5           | 5          | —                | 6            | 18           | 14           | 1            |
|               | 24-VIII-32                 | 70          | 3           | 4          | —                | 4            | 12           | 4            | 1            |
|               | 26-VIII-32                 | 64          | 2           | 2          | —                | 7            | 8            | 10           | 3            |
|               | 29-VIII-32                 | 65          | 5           | 5          | 1                | 3            | 9            | 5            | 1            |
|               | 31-VIII-32                 | 47          | 2           | 4          | —                | —            | 43           | —            | —            |
|               | 2-IX-32                    | 61          | —           | 6          | 1                | 5            | 13           | 9            | 2            |
|               | 5-IX-32                    | 78          | 3           | 5          | 1                | 4            | 4            | 4            | —            |
| 50            | 15-VIII-32                 | 91          | —           | 4          | —                | —            | —            | 1            | 2            |
|               | 22-VIII-32                 | 75          | 5           | 2          | —                | 1            | 8            | 2            | 5            |
|               | 24-VIII-32                 | 82          | 2           | 1          | 1                | 4            | 5            | 3            | —            |
|               | 26-VIII-32                 | 51          | —           | 2          | —                | 3            | 20           | 12           | 9            |
|               | 29-VIII-32                 | 66          | 3           | 10         | —                | 8            | 12           | —            | —            |
|               | 31-VIII-32                 | 43          | 12          | 8          | —                | 6            | 12           | 12           | 4            |
|               | 2-IX-32                    | 91          | 1           | 5          | —                | 1            | —            | 1            | 1            |
|               | 5-IX-32                    | 63          | 1           | 7          | 1                | 3            | 4            | 5            | 14           |

1. No es posible diferenciar los núcleos de los polinucleares, porque no poco teñidos.

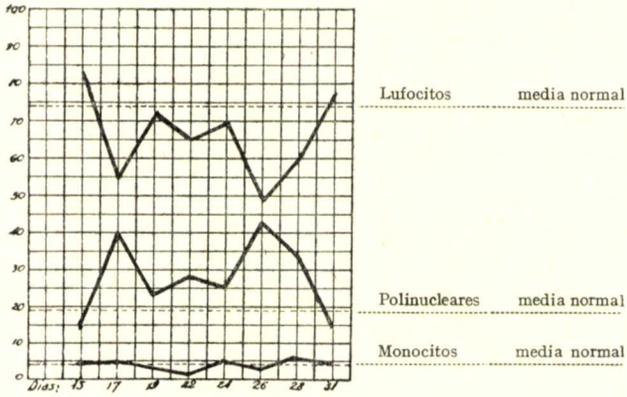
Lote I

día 15 de agosto, con 2 cc. de Mallei 22

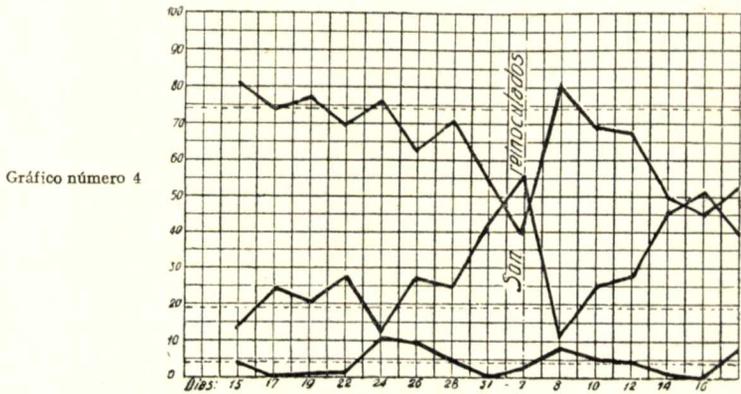
| Eosinófilos | Basófilos | Pleocariocitos | Polinucleares alterados | Células de Rieder | Hemocitoblastos | Total            | Observaciones |
|-------------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|
| —           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| —           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | 5         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100 <sup>1</sup> |               |
| I           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | —         | I              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| —           | —         | —              | —                       | 2                 | —               | 100              |               |
| I           | —         | —              | —                       | I                 | —               | 100              |               |
| 3           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| —           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |
| I           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100              |               |

se tiñen. Granulaciones dispersas. Algo parecido en los basófilos. Los linfocitos

CONEJO N.º 47  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)



CONEJO N.º 48  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)



CONEJO N.º 49  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)

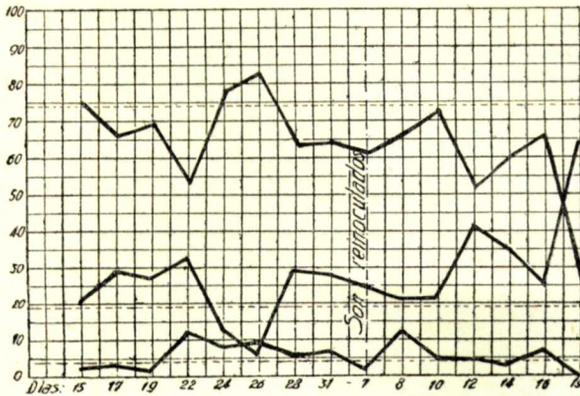


Gráfico número 5

CONEJO N.º 50  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)

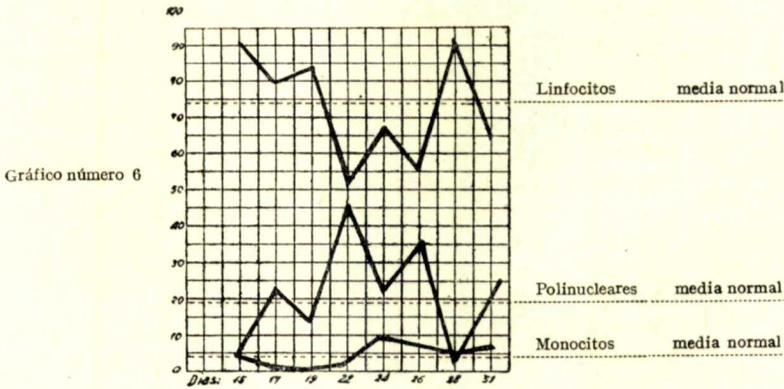


Gráfico número 6

*Conejos inoculados de primera intención el día 15 de agosto, con  
el día 7 de*

| Conejo<br>número | Fecha<br>de la toma<br>de sangre | Linfo-<br>citos | Micro-<br>citos | Mono-<br>citos | Índice de Arneth |                 |                 |                 |                 |
|------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                                  |                 |                 |                | De<br>1 núcleo   | De<br>2 núcleos | De<br>3 núcleos | De<br>4 núcleos | De<br>5 núcleos |
| 48               | 15-VIII-32                       | 81              | —               | 4              | —                | 4               | 4               | 3               | 1               |
|                  | 22-VIII-32                       | 66              | 8               | 1              | —                | —               | 10              | 7               | 7               |
|                  | 24-VIII-32                       | 77              | —               | 1              | —                | 3               | 7               | 7               | 1               |
|                  | 26-VIII-32                       | 65              | 5               | 2              | —                | 1               | 7               | 12              | 5               |
|                  | 29-VIII-32                       | 66              | 10              | 12             | —                | 4               | 6               | 1               | —               |
|                  | 31-VIII-32                       | 58              | 5               | 10             | —                | 4               | 13              | 5               | 2               |
|                  | 2-IX-32                          | 65              | 6               | 4              | —                | 2               | 6               | 9               | 6               |
|                  | 5-IX-32                          | 51              | 6               | 1              | —                | 3               | 9               | 19              | 10              |
|                  | 7-IX-32                          | 40              | —               | 3              | 2                | 6               | 20              | 18              | 8               |
|                  | 10-IX-32                         | 81              | —               | 8              | —                | —               | 6               | 4               | —               |
|                  | 12-IX-32                         | 62              | 8               | 5              | —                | 6               | 8               | 7               | 4               |
|                  | 14-IX-32                         | 64              | 4               | 5              | —                | 5               | 12              | 7               | 2               |
|                  | 16-IX-32                         | 50              | —               | 2              | 1                | 10              | 12              | 11              | 10              |
|                  | 19-IX-32                         | 45              | 3               | —              | —                | 8               | 13              | 13              | 13              |
| 21-IX-32         | 8                                | 43              | 8               | —              | 16               | 14              | 9               | 2               |                 |
| 49               | 15-VIII-32                       | 77              | —               | 2              | —                | 4               | 7               | 3               | 5               |
|                  | 22-VIII-32                       | 57              | 10              | 3              | 1                | 1               | 12              | 9               | 5               |
|                  | 24-VIII-32                       | 64              | 6               | 2              | 1                | 3               | 12              | 6               | 1               |
|                  | 26-VIII-32                       | 54              | —               | 12             | —                | 6               | 21              | 2               | —               |
|                  | 29-VIII-32                       | 63              | 15              | 8              | —                | 3               | 6               | 3               | —               |
|                  | 31-VIII-32                       | 79              | 4               | 9              | —                | 3               | 2               | —               | —               |
|                  | 2-IX-32                          | 62              | 2               | 5              | 1                | 8               | 5               | 7               | 6               |
|                  | 5-IX-32                          | 63              | 1               | 7              | 1                | 3               | 4               | 5               | 14              |
|                  | 7-IX-32                          | 67              | 5               | 2              | —                | 4               | 13              | 5               | 1               |
|                  | 10-IX-32                         | 64              | 2               | 12             | 1                | 2               | 7               | 6               | 3               |
|                  | 12-IX-32                         | 70              | 3               | 5              | —                | 2               | 4               | 7               | 7               |
|                  | 14-IX-32                         | 50              | 2               | 5              | —                | 10              | 9               | 14              | 7               |
|                  | 16-IX-32                         | 56              | 4               | 4              | —                | 6               | 12              | 10              | 4               |
|                  | 19-IX-32                         | 56              | 11              | 7              | —                | 5               | 6               | 5               | 8               |
| 21-IX-32         | 22                               | 3               | —               | —              | 1                | 28              | 30              | 13              | 3               |



## Conejos inoculados de primera intención el día

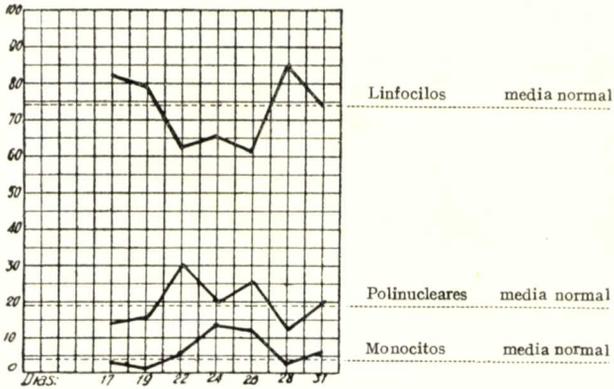
| Conejo número | Fecha de la toma de sangre | Linfocitos | Microcitos | Monocitos | Índice de Arneth |              |              |              |              |
|---------------|----------------------------|------------|------------|-----------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                            |            |            |           | De 1 núcleo      | De 2 núcleos | De 3 núcleos | De 4 núcleos | De 5 núcleos |
| 51            | 15-VIII-32                 | 83         | —          | 3         | —                | 3            | 2            | 2            | 5            |
|               | 22-VIII-32                 | 75         | 5          | 2         | —                | 1            | 8            | 2            | 5            |
|               | 26-VIII-32                 | 54         | 9          | 6         | —                | 5            | 15           | 9            | 1            |
|               | 29-VIII-32                 | 65         | 1          | 14        | 1                | 4            | 9            | —            | —            |
|               | 31-VIII-32                 | 55         | 7          | 13        | —                | 3            | 4            | —            | —            |
|               | 2-IX-32                    | 76         | 9          | 3         | —                | 2            | 6            | 3            | —            |
|               | 5-IX-32                    | 62         | 12         | 5         | —                | —            | 3            | 7            | 8            |
| 52            | 15-VIII-32                 | 69         | —          | 5         | —                | 5            | 11           | 3            | 5            |
|               | 22-VIII-32                 | 50         | 30         | 1         | 1                | 5            | 11           | —            | —            |
|               | 24-VIII-32                 | 79         | 4          | 2         | —                | 2            | 6            | 4            | —            |
|               | 26-VIII-32                 | 63         | 4          | 7         | —                | 4            | 13           | 7            | —            |
|               | 29-VIII-32                 | 61         | 4          | 14        | —                | 1            | 8            | 7            | —            |
|               | 31-VIII-32                 | 70         | 2          | 11        | —                | 2            | 1            | —            | 4            |
|               | 2-IX-32                    | 72         | 1          | 3         | —                | —            | 7            | 6            | 8            |
|               | 5-IX-32                    | 67         | 7          | 2         | —                | —            | 11           | 7            | 4            |

## Lote III

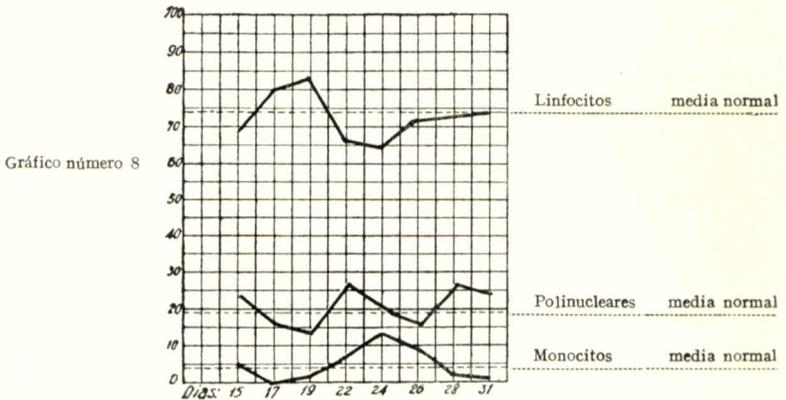
15 de agosto, con 2 cc. de *Mallei cobayo*

| Eosinófilos | Basófilos | Pleocariocitos | Polinucleares alterados | Células de Rieder | Hemocitoblastos | Total | Observaciones                   |
|-------------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------|---------------------------------|
| I           | —         | I              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| —           | —         | —              | —                       | 2                 | —               | 100   |                                 |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| —           | 6         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| —           | 5         | —              | 13                      | —                 | —               | 100   |                                 |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| 2           | —         | —              | —                       | I                 | —               | 100   |                                 |
| —           | —         | —              | —                       | 2                 | —               | 100   |                                 |
| —           | —         | —              | —                       | 2                 | —               | 100   | Núcleos polinucleares borrosos. |
| 2           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| I           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| I           | 3         | I              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| I           | 2         | —              | 6                       | —                 | I               | 100   | Presencia de hemoblastos.       |
| —           | 3         | I              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |
| I           | —         | I              | —                       | —                 | —               | 100   |                                 |

CONEJO N.º 51  
inoculado Mallei virulento



CONEJO N.º 52  
inoculado Mallei virulento



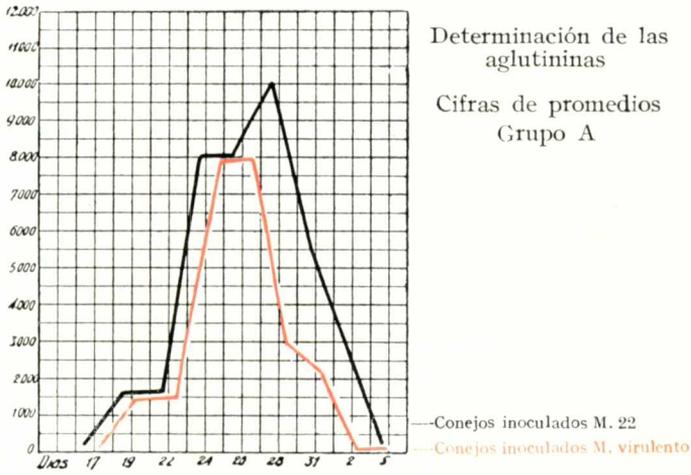


Gráfico número 15

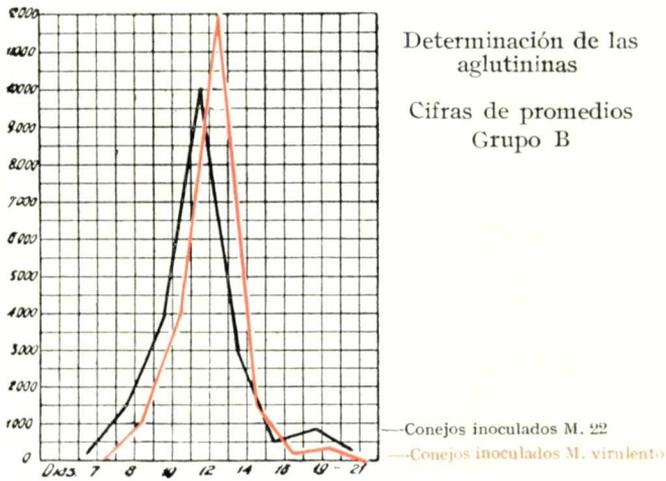


Gráfico número 16



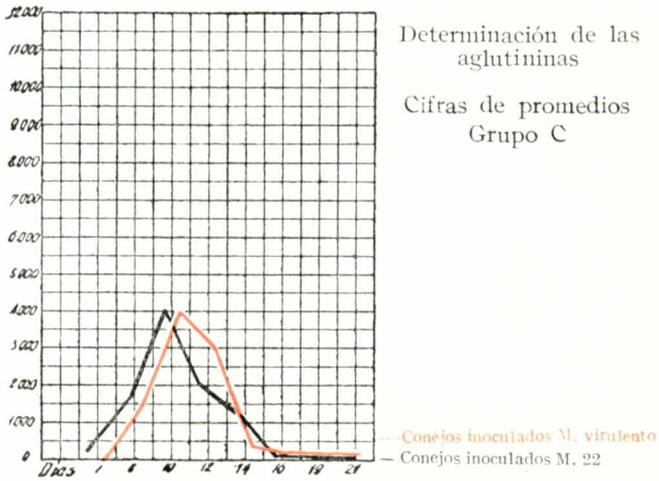


Gráfico número 17

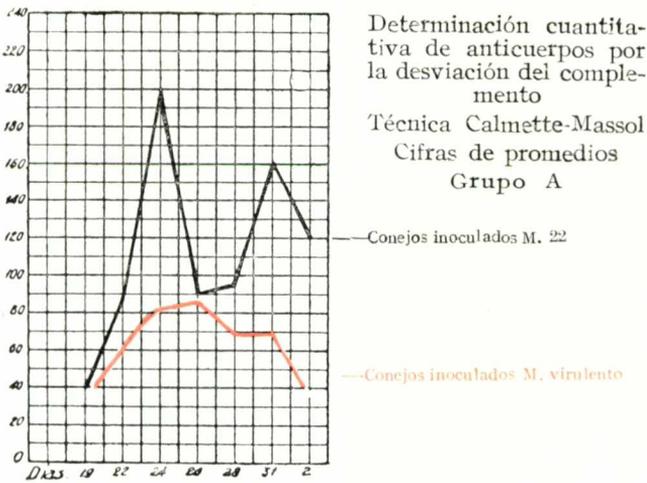
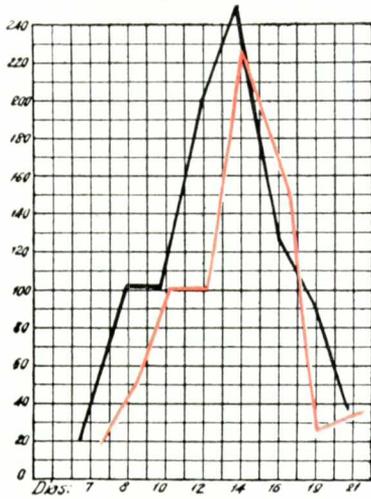


Gráfico número 18

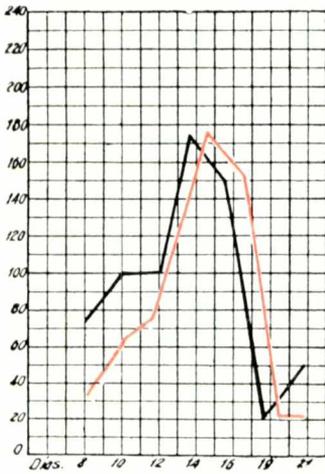




Determinación cuantitativa de anticuerpos por la desviación del complemento

Técnica Calmette-Massol  
Cifras de promedios  
Grupo B

Gráfico número 19



Determinación cuantitativa de anticuerpos por la desviación del complemento

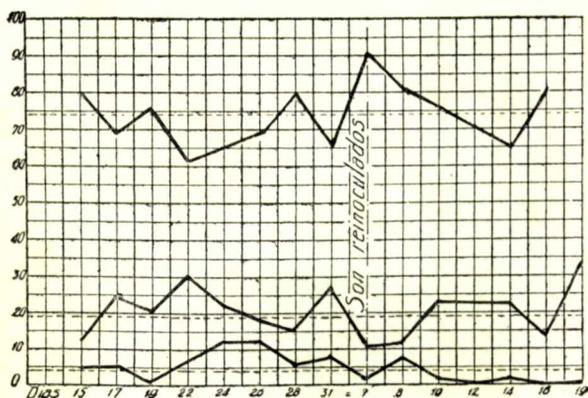
Técnica Calmette-Massol  
Cifras de promedios  
Grupo C

Gráfico número 20



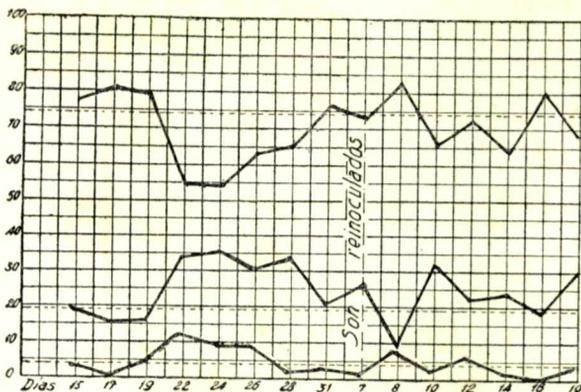
CONEJO N.º 53  
inoculado Mallei virulento

Gráfico número 9



CONEJO N.º 56  
inoculado Mallei virulento

Gráfico número 10



Conejos inoculados de primera intención el día 15 de agosto, con  
el día 7 de

| Conejo<br>número | Fecha<br>de la toma<br>de sangre | Linfo-<br>citos | Micro-<br>citos | Mono-<br>citos | Índice de Arneth |                 |                 |                 |                 |
|------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                                  |                 |                 |                | De<br>1 núcleo   | De<br>2 núcleos | De<br>3 núcleos | De<br>4 núcleos | De<br>5 núcleos |
| 53               | 15-VIII-32                       | 80              | —               | 5              | 1                | 1               | 1               | 6               | 4               |
|                  | 22-VIII-32                       | 64              | 5               | 5              | 2                | 5               | 7               | 6               | 5               |
|                  | 24-VIII-32                       | 75              | 2               | 1              | 1                | 5               | 10              | 5               | —               |
|                  | 26-VIII-32                       | 54              | 7               | 7              | —                | 2               | 17              | 11              | 1               |
|                  | 29-VIII-32                       | 60              | 5               | 12             | 1                | 3               | 12              | 4               | 3               |
|                  | 31-VIII-32                       | 64              | 5               | 13             | —                | —               | 1               | —               | —               |
|                  | 2-IX-32                          | 79              | 1               | 5              | —                | 1               | 4               | 3               | 5               |
|                  | 5-IX-32                          | 65              | —               | 8              | —                | 2               | 8               | 10              | 5               |
|                  | 7-IX-32                          | 87              | 4               | 2              | —                | 3               | 1               | 3               | 1               |
|                  | 10-IX-32                         | 77              | 3               | 8              | 2                | 1               | 3               | 3               | 2               |
|                  | 12-IX-32                         | 64              | 11              | 2              | —                | 10              | 9               | 2               | 1               |
|                  | 14-IX-32                         | —               | —               | —              | —                | —               | —               | —               | —               |
|                  | 16-IX-32                         | 62              | 3               | 1              | 1                | 4               | 6               | 7               | 3               |
|                  | 19-IX-32                         | 73              | 8               | —              | —                | 2               | 1               | 6               | 3               |
| 21-IX-32         | 19                               | 6               | 4               | —              | 19               | 12              | 10              | 1               |                 |
| 56               | 15-VIII-32                       | 77              | —               | —              | —                | 1               | 6               | 6               | 5               |
|                  | 22-VIII-32                       | 47              | 33              | 2              | —                | 2               | 7               | 5               | 1               |
|                  | 24-VIII-32                       | 72              | 7               | 5              | —                | —               | 8               | 4               | —               |
|                  | 26-VIII-32                       | 54              | —               | 12             | —                | 6               | 21              | 2               | —               |
|                  | 29-VIII-32                       | 52              | 2               | 10             | —                | 1               | 14              | 13              | 7               |
|                  | 31-VIII-32                       | 58              | 5               | 10             | —                | 1               | 16              | 6               | 1               |
|                  | 2-IX-32                          | 59              | 6               | 2              | —                | 4               | 8               | 8               | 10              |
|                  | 5-IX-32                          | 71              | 5               | 3              | —                | —               | 9               | 10              | 1               |
|                  | 7-IX-32                          | 73              | —               | 1              | 2                | 3               | 9               | 6               | 4               |
|                  | 10-IX-32                         | 74              | 9               | 8              | —                | 2               | 2               | 2               | 2               |
|                  | 12-IX-32                         | 57              | 10              | 2              | —                | 9               | 13              | 5               | 3               |
|                  | 14-IX-32                         | 62              | 10              | 6              | 1                | 3               | 7               | 9               | 1               |
|                  | 16-IX-32                         | 45              | 19              | 2              | —                | 1               | 8               | 8               | 4               |
|                  | 19-IX-32                         | 30              | 50              | 1              | —                | 2               | 5               | 5               | 1               |
| 21-IX-32         | 58                               | 8               | 3               | —              | 6                | 11              | 9               | 4               |                 |

Lote IV

2 cc. de *Mallei cobayo*, y reinoculados con 3 cc. del mismo germen  
septiembre

| Eosinófilos | Basófilos | Pleocariocitos | Polinucleares alterados | Células de Rieder | Hemocitoblastos | Total | Observaciones                                |
|-------------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------|--|
| 2           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | —         | I              | —                       | —                 | —               | 100   | Presencia de algún mononuclear con gérmenes. |
| 2           | 4         | —              | II                      | —                 | —               | 100   |  |
| —           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Algunos normoblastos.                        |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | I         | —              | —                       | 3                 | —               | 100   |  |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | I         | —              | —                       | —                 | I               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | I              | —                       | I                 | —               | 100   |  |
| I           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | 4         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| 2           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| —           | I         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |
| I           | 5         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Gran alteración en los glóbulos rojos.       |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |  |

## Conejos inoculados de primera intención et

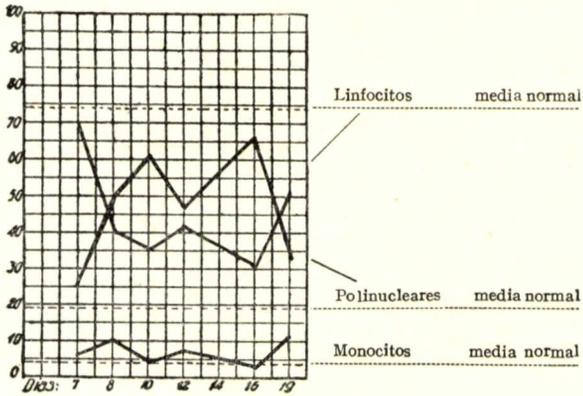
| Conejo número | Fecha de la toma de sangre | Linfocitos | Microcitos | Monocitos | Índice de Arneth |              |              |              |              |
|---------------|----------------------------|------------|------------|-----------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                            |            |            |           | De 1 núcleo      | De 2 núcleos | De 3 núcleos | De 4 núcleos | De 5 núcleos |
| 57            | 7-IX-32                    | 70         | —          | 6         | 1                | 4            | 14           | 3            | —            |
|               | 10-IX-32                   | 32         | 8          | 10        | —                | 13           | 18           | 10           | 7            |
|               | 12-IX-32                   | 35         | —          | 4         | 6                | 16           | 25           | 10           | 3            |
|               | 14-IX-32                   | 42         | 6          | 7         | 1                | 16           | 16           | 6            | 4            |
|               | 16-IX-32                   | —          | —          | —         | —                | —            | —            | —            | —            |
|               | 19-IX-32                   | 29         | 2          | 3         | —                | 14           | 16           | 24           | 10           |
|               | 21-IX-32                   | 51         | —          | 16        | —                | 4            | 13           | 5            | 7            |
| 58            | 7-IX-32                    | 55         | 2          | —         | —                | 11           | 10           | 9            | 3            |
|               | 10-IX-32                   | 59         | —          | 13        | 1                | 8            | 10           | 7            | 1            |
|               | 12-IX-32                   | 27         | 3          | 6         | 5                | 17           | 22           | 12           | 5            |
|               | 14-IX-32                   | 46         | —          | 9         | 1                | 10           | 18           | 10           | 3            |
|               | 16-IX-32                   | 38         | 8          | 6         | 3                | 12           | 15           | 6            | 4            |
|               | 19-IX-32                   | 51         | 10         | 5         | —                | 7            | 15           | 5            | 1            |
|               | 21-IX-32                   | 34         | 25         | 3         | —                | 6            | 20           | 7            | —            |

## Lote V

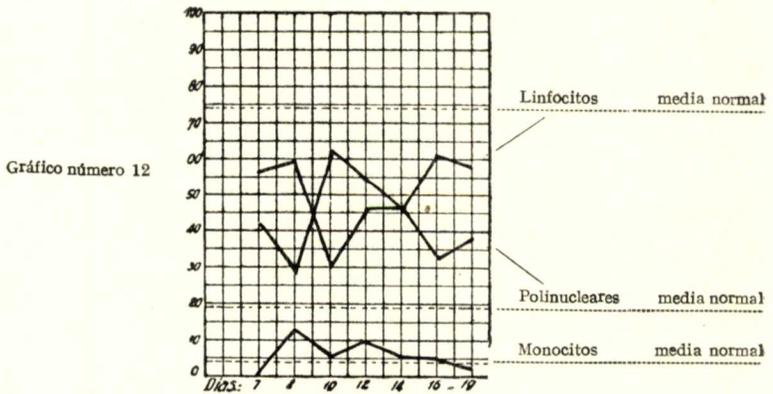
día 7 de septiembre, con 3 cc. de Mallei 22

| Eosinófilos | Basófilos | Pleocariocitos | Polinucleares alterados | Células de Rieder | Hemocitoblastos | Total | Observaciones                       |
|-------------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------|-------------------------------------|
| 1           | 1         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 1         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| 1           | 1         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | —         | —              | —                       | —                 | —               | —     | Anulada.                            |
| —           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 4         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| 6           | 3         | 1              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 1         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Pseudoeosinófilos destruidos.       |
| —           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Menor destrucción de polinucleares. |
| 1           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 6         | —              | —                       | 2                 | —               | 100   |                                     |
| 3           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| 1           | 4         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |

CONEJO N.º 57  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)

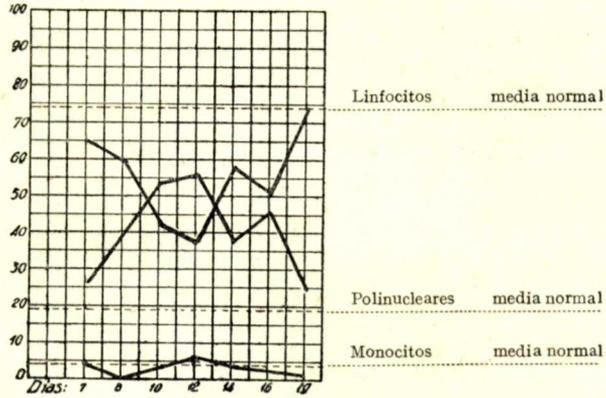


CONEJO N.º 58  
inoculado Mallei avirulento (M. 22)



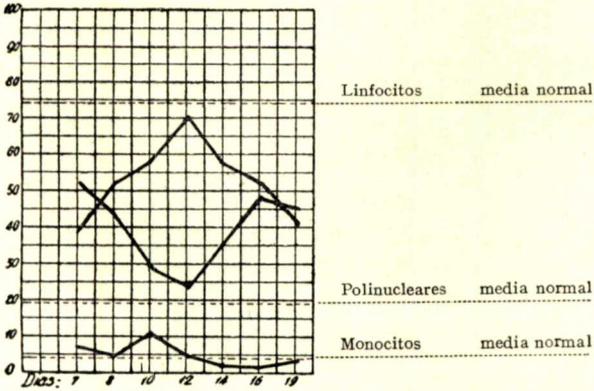
CONEJO N.º 59  
inoculado Mallei virulento

Gráfico número 13



CONEJO N.º 60  
inoculado Mallei virulento

Gráfico número 14



## Conejos inoculados de primera intención el día

| Conejo número | Fecha de la toma de sangre | Linfocitos | Microcitos | Monocitos | Índice de Arneth |              |              |              |              |
|---------------|----------------------------|------------|------------|-----------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |                            |            |            |           | De 1 núcleo      | De 2 núcleos | De 3 núcleos | De 4 núcleos | De 5 núcleos |
| 59            | 7-IX-32                    | 57         | 9          | 4         | —                | 2            | 8            | 7            | 8            |
|               | 10-IX-32                   | 53         | 7          | —         | 2                | 14           | 15           | 6            | 2            |
|               | 12-IX-32                   | 36         | 7          | 3         | 1                | 12           | 24           | 15           | 1            |
|               | 14-IX-32                   | 34         | 4          | 5         | —                | 4            | 23           | 17           | 8            |
|               | 16-IX-32                   | 58         | —          | 4         | 1                | 15           | 10           | 8            | 3            |
|               | 19-IX-32                   | 42         | 9          | 3         | —                | 11           | 19           | 10           | 4            |
|               | 21-IX-32                   | 64         | 10         | 2         | —                | 6            | 9            | 7            | 2            |
| 60            | 7-IX-32                    | 50         | 2          | 7         | 1                | 3            | 13           | 12           | 7            |
|               | 10-IX-32                   | 33         | 10         | 5         | —                | 7            | 15           | 15           | 10           |
|               | 12-IX-32                   | 29         | —          | 12        | 2                | 17           | 21           | 13           | 2            |
|               | 14-IX-32                   | 24         | —          | 5         | 2                | 24           | 20           | 19           | 4            |
|               | 16-IX-23                   | 36         | 1          | 3         | 1                | 16           | 27           | 10           | 3            |
|               | 19-IX-32                   | 34         | 11         | 2         | —                | 17           | 19           | 11           | 3            |
|               | 21-IX-32                   | 35         | 10         | 4         | —                | 14           | 11           | 7            | 5            |

## Lote VI

7 de septiembre, con 3 cc. de *Mallei cobayo*

| Eosinófilos | Basófilos | Pleocariocitos | Polinucleares alterados | Células de Rieder | Hemocitoblastos | Total | Observaciones                       |
|-------------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------|-------------------------------------|
| —           | 2         | 2              | —                       | I                 | —               | 100   |                                     |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| I           | 3         | I              | —                       | —                 | —               | 100   | Dstrucción de polinucleares.        |
| I           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| 2           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Anisocitosis y poiquilocitosis.     |
| 2           | —         | 2              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 5         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| I           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| 2           | —         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| I           | 2         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 3         | —              | —                       | —                 | —               | 100   |                                     |
| —           | 5         | —              | —                       | —                 | —               | 100   | Gran destrucción de glóbulos rojos. |

## INVESTIGACIÓN DE AGLUTININAS

Hemos utilizado un antígeno único, el Mallei 22, por ser más manejable en razón de su inocuidad y por haber visto en investigaciones anteriores que se comporta igual, frente a sueros de diversos animales muermosos, que las emulsiones de gérmenes virulentos. Utilizamos emulsiones frescas, porque su especificidad y su sensibilidad es superior a las diluciones de maleínas, que siempre son un producto impuro, por contener mayor cantidad de proteínas extrañas, procedentes de los medios de cultivo. Puestas en contacto las diluciones de suero con emulsiones microbianas, son colocadas a la estufa a 37° y leídos los resultados a las veinticuatro horas.

Hemos repartido las experiencias en tres lotes, A. B. C.

En A, hemos agrupado los conejos que son inoculados por primera vez; en B, los resultados de la reinoculación en algunos de los mismos, y en C, un nuevo lote que tiene el valor de comprobación de los anteriores.

Los resultados son fáciles de comentar.

En el grupo A, la cifra máxima es alcanzada por los conejos inoculados con Mallei 22. En el grupo B, los inoculados con Mallei virulento presentan un título superior. En el grupo C, los resultados son prácticamente iguales. Se observa un fenómeno parecido al comentado al tratar de la fórmula leucocitaria. A la primera inoculación la curva de aglutininas no alcanza su máximo hasta once días después de inoculados. Mientras que en los reinoculados, en razón posiblemente a fenómenos de inmunidad, la cifra más alta es ya alcanzada a los cinco días.

Sea como sea, si sumáramos las cifras obtenidas por los tres grupos, alcanzaríamos una igualdad casi matemática (8,000 unidades para los dos antígenos). Por lo tanto, también en esta experiencia comprobamos un idéntico poder para la formación de aglutininas.

#### LA DESVIACIÓN DEL COMPLEMENTO

Para estas experiencias nos hemos servido de los sueros de nuestros conejos, previamente inactivados y diluídos. Utilizamos una técnica cuantitativa, cual es la de Calmette y Masol, modificación Matthis y Labougle. Como antígeno empleamos una emulsión fresca de Mallei 22. En otras investigaciones anteriores habíamos visto también que los sueros de caballo y asno muermoso reaccionaban igual ante un antígeno preparado con Mallei virulento o con nuestro Mallei 22.

La observación de nuestras gráficas de promedios y los resultados individuales dicen claramente que nuestro Mallei 22 no ha perdido en absoluto la facultad de producir anticuerpos demostrables por la desviación del complemento. Se nota más bien un aumento claro en favor del antígeno atenuado en los ensayos correspondientes al grupo A. Acaso pueda achacarse a una mayor especificidad de elementos, pues no hemos de pretender que todavía sea mayor el poder de los microbios atenuados que el de los virulentos. En buena lógica nos podemos contentar con que sea igual.

También aquí se observa en los conejos reinoculados, correspondientes al grupo B, unos títulos de unidades de anticuerpos, francamente superiores a los de los conejos que podríamos llamar controles de experiencia (grupo C), y a las cifras obtenidas en los

mismos animales cuando se sometieron a la primera inoculación.

Como en todas nuestras experiencias que acabamos de describir, coinciden las reacciones en intensidad y rapidez. Este fenómeno se presta a teorizar un poco y no sabemos resistir a la tentación de intentar explicarlo, siguiendo la más pura ortodoxia biológica.

Mientras los gérmenes permanecen en su foco de inoculación, vemos que la fórmula leucocitaria no es modificada grandemente, y sólo al tener lugar la emigración de los elementos hemáticos al torrente circulatorio con su acompañamiento de elementos destruidos y enfermos, lo que significa lisis de estas células, observamos conjuntamente la aparición de las cifras más elevadas de anticuerpos. Y, reflexionando sobre estos hechos experimentales, no diremos nada nuevo si pensamos que los anticuerpos que valoramos *in vitro* han sido trasladados al torrente circulatorio por los leucocitos al entregarle su propio organismo, producto del metabolismo de los elementos del antígeno por los fermentos celulares. En nuestro caso particular puede sospecharse que los anticuerpos han sido fabricados en el seno del protoplasma leucocitario y que éste, por su catabolia o por su lisis, los abandona al medio interno, donde los descubrimos con nuestras técnicas de laboratorio. La coincidencia de valores observados nos lleva racionalmente a pensar en la teoría de Metchnikoff para explicar los hechos. De todos modos, nada tiene de particular, pues una teoría inmunitaria no es un mecanismo universal, sino un aspecto parcial de los complicados fenómenos inmunológicos. En el caso que estudiamos, bien podría ser este clásico fenómeno el origen de los anticuerpos demostrables por los artificios de laboratorio.

### CONCLUSIONES

De nuestras investigaciones se deduce que la atenuación no modifica para nada el poder de formar anticuerpos ni de producir alteraciones en la fórmula leucocitaria. Para el caso concreto del microbio del muermo, no parece existir en el protoplasma microbiano substancia alguna que demuestre una propiedad distinta, según se trate de gérmenes en plena virulencia o bien de gérmenes absolutamente privados de todo poder patógeno. El organismo conejo, al cual fueron inoculados nuestros antígenos, reaccionó de una manera sensiblemente igual ante las emulsiones de gérmenes virulentos o atenuados, muertos por el calor a 60° durante una hora.

*Instituto de Biología Animal. Madrid.*