

INSTITUTO DE BACTERIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

## SOBRE LA PRESENCIA DE SUBSTANCIAS ESPECIFICAS

EN LOS

### LEUCOCITOS EN LA INMUNIDAD ANTI-INFECCIOSA

La presencia en la sangre circulante del amboceptor y su acción sobre los elementos sensibles dejándolos modificados de tal modo que su lisis o fagocitosis se efectúa fácilmente, quitaron gran importancia a los glóbulos blancos en la explicación del proceso de la inmunización en contra de los microbios.

La demostración de Denys y Leclef (1) no dejó lugar a dudas de que, por lo menos "in vitro", la acción decisiva sobre los microorganismos la ejerce el suero específico, el que es factor esencial de la fagocitosis en el tubo de ensayo. Nos demostraron también estos autores que en las experiencias "in vitro" no se diferencian entre sí, los leucocitos, ya sea que provengan de animales inmunizados o de seres vírgenes de vacunación.

Estas bellas experiencias daban aparentemente un golpe de muerte a las ideas sustentadas por el ilustre Metchnikoff, sobre las posibles modificaciones de los leucocitos, tesis que él sostenía para la explicación de la inmunidad.

Los trabajos posteriores confirmaron las experiencias de los sabios belgas.

Los de Wright (2) y su escuela al ampliarlos, demostrándonos que la acción de la opsonina del suero normal favorecía la fagoci-

tosis, actuando sobre los microorganismos, dejándolos modificados de tal modo que ellos son fácil presa de los fagocitos y no sobre los leucocitos; eran otros fundamentales argumentos en contra de la tesis sostenida por el sabio biólogo ruso. Hipótesis que también fué refutada por las constataciones de Neufeld (3) y sus colaboradores, quienes estudiando la acción de los sueros específicos, demostraron que la acción de ellos se ejerce, al igual a lo que pasa con las opsoninas, sobre los microbios y no sobre los leucocitos. Las bacteriotropinas, nombre con el cual se bautizó a las substancias de los sueros específicos que tienen ese poder de modificar a los microbios, para tomarlos fácilmente fagocitables, eran pues otro poderoso argumento en contra de la hipótesis que asignaba a los glóbulos blancos el papel realmente activo en la inmunidad.

Estos trabajos experimentales parecían relegar a los leucocitos a un lugar secundario en la lucha que sostienen el hombre y los animales en contra de los microorganismos que los invaden, pues los fagocitos solamente serían capaces de eliminar o englobar a los microbios que previamente hubiesen sido marcados por la acción específica y directriz de los humores por intermedio de los anticuerpos disueltos en su seno; echando también por tierra la posibilidad de la existencia de las estimulinas, cuerpos que según el sabio profesor ruso actuarían activando los leucocitos.

Metchinikoff a pesar de no poder objetar las experiencias de sus contrincantes, las cuales dentro del dispositivo experimental, en que ellos se colocan son completamente exactas, aducía siempre, con justa razón, que estas pruebas en el tubo de ensayo, solo pueden ser un pálido reflejo de lo que pasa en el organismo vivo.

Muchas de las experiencias de los discípulos del sabio biólogo ruso, especialmente las de Cantacuzenie (4), Oppel (5), George-witch (6), Chaukewitch (7), Delance (8), etc. Demostraban muy a las claras la capital importancia de los leucocitos en la lucha en contra de las infecciones, aún en aquellos casos en los cuales los animales estaban sólidamente inmunizados. Estos a pesar de poseer grandes cantidades de anticuerpos en su torrente circulatorio,

morian si, al ser infestados peritonealmente, se impedía de una u otra manera el aflujo leucocitario a esa serosa; hecho que fué confirmado por algunos observadores de la escuela alemana, Weil (9) entre otros.

Por mi parte la serie de experiencias que he efectuado en el transcurso de varios años me evidenciaron que los leucocitos de los animales sólidamente vacunados adquieren en la inmunidad anti-infecciosa propiedades nuevas, mediante las cuales ellos se muestran más aptos que los leucocitos comunes en la lucha en contra de los microbios, propiedades perfectamente constatables "in vivo".

En la infección peritoneal del conejillo de la India efectuado mediante la inyección de cultivo virulento del bacilo de Eberth, he podido convencerme que se puede salvar a los animalitos mediante una leucocitosis pasiva, es decir inyectándole al cobayo, momentos antes de la infección, el exudado tomado a otro animalito de la misma especie.

En el análisis de este fenómeno he conseguido demostrar que son realmente los leucocitos los que intervienen activamente para salvar al animalito de una muerte cierta, porque separando a los glóbulos blancos, en su gran mayoría constituidos por polinucleares, mediante la sedimentación e inyectándolos, previa emulsión en solución fisiológica, en el peritoneo de los animales antes de la infección, se salvan de la muerte. En cambio los chanchitos inyectados con el plasma en el cual estaban suspendidos los leucocitos del exudado mueren al mismo tiempo que los testigos o antes.

Para ilustrar estas afirmaciones copiaré a continuación algunas de mis experiencias anteriormente publicadas (II).

	Cantidad de plasma inyectado	Cantidad de células inyectadas	Cantidad de cultivo inoculado	Resultado
Ch. N. 1 200 gr-	10. c. c.		1 c. c.	Muere en 22 horas
Ch. N. 2 mos de		Las suspendidas en 10.c.c.	1 c. c.	Se salva
Ch. N. 3 peso		Testigo.	1 c. c.	Muere en 26 horas

Las células y el plasma inyectados provenían del exudado peritoneal provocado en un cobayo por inyección de somatosa. El exudado fué sedimentado, las células separadas del plasma y emulsionadas en solución fisiológica. Todas las *inoculaciones* se efectuaron en el peritoneo.

Esta experiencia y otras que pueden verse en el trabajo mencionado son bien instructivas y demuestran la importancia que tienen los leucocitos en la inmunidad natural.

Efectuando constataciones previas, pude poner de manifiesto, que se necesita una leucocitosis peritoneal pasiva de alrededor de 600 millones de leucocitos, provenientes de animales vírgenes de inmunización, para salvar a un animalito de la peritonitis provocada por la inyección del bacilo de Eberth. En cambio la misma clase de células tomadas de animales inmunizados son sesenta veces más activas que sus congéneres comunes.

Para demostrar la verdad de mis afirmaciones copio las siguientes experiencias de uno de mis trabajos anteriores.

Peso en gramos	Cantidad de fagocitos inmunes inyectados	Cantidad de fagocitos nuevos inyectados	Cultivo inoculado	
Ch. N. 1.530	100.000.000		1.5 c.c.	Se sal.
Ch. N. 2.510	50.000.000		1.2 c.c.	id
Ch. N. 3.530	20.000.000		1.5 c.c.	id
Ch. N. 4.540	10.000.000		1.4 c.c.	id
Ch. N. 5.510	5.000.000		1.2 c.c.	muere
Ch. N. 6.540			1.4 c.c.	id
Ch. N. 7.510		600.000.000	1.2 c.c.	id
Ch. N. 8.510	Testigo	100.000.000	1.2 c.c.	id

Los leucocitos, tanto los del animal inmunizado como los extraídos al nuevo, son privados de su plasma antes de emplearlos. Las inyecciones lo mismo que las inoculaciones se efectúan en el peritoneo.

No solo adquieren los leucocitos propiedades especiales en los animales vacunados activamente, sino que también las poseen aquellos que provienen de cobayos inmunizados pasivamente, como pue-

de verse en la siguiente experiencia tomada también del trabajo mencionado anteriormente.

Peso en gramos	Cantidad de fagocitos inmunes inyectados	Cantidad de plasma inmune inyectado	Cantidad de cultivo inoculado	Resultado
Ch. N. 1.280	45.000.000		0.6 c. c.	muere
Ch. N. 2.500	135.000.000		0.6 c. c.	muere
Ch. N. 3.280	225.000.000		0.6 c. c.	se salva
Ch. N. 4.500		1 c. c.	0.6 c. c.	muere
Ch. N. 5.280		5 c. c.	0.6 c. c.	muere
Ch. N. 6.500		5 c. c.	0.6 c. c.	muere
Ch. N. 7.280		Testigo	0.6 c. c.	muere

Tanto las inyecciones como las infecciones se efectúan en el peritoneo.

Los tres primeros animalitos de esta serie reciben en la cavidad peritoneal las cantidades indicadas de fagocitos provenientes de un animal inmunizado pasivamente mediante la inyección de 3 c. c. de suero específico efectuado en el peritoneo 48 horas antes de extraer los leucocitos para la experiencia referida.

El exudado fué previamente sedimentado, decantado y luego las células fueron emulsionadas en solución fisiológica.

Los animalitos N. 4, 5 y 6 recibieron el plasma residuo de la sedimentación, en cantidades tales que corresponde a aquella en la cual estaban suspendidos en el exudado los leucocitos que fueron inyectados a los cobayos N. 1, 2, y 3.

Por el resultado de esta experiencia se ve que, aún las células provenientes de los animales inmunizados pasivamente adquieren propiedades nuevas que los tornan más aptos que sus congéneres comunes para la lucha en contra de los microbios. Es en este caso, tanto más decisiva la observación experimental, por cuanto el plasma del exudado, aún en cantidades tan grandes como las empleadas en esta experiencia, se manifiesta inactivo.

A pesar de esta última constatación se podría objetar que, en la inmunidad antitífica los anticuerpos plasmáticos aumentan tan considerablemente durante el proceso de la vacunación que ellos no

podrían ser totalmente eliminados de los leucocitos por el tratamiento previo a que se les somete; máxime si se piensa que los glóbulos blancos podrían mediante el fenómeno de la adsorción concentrar el anticuerpo alrededor de su superficie. De todos modos aún suponiendo la presencia de este fenómeno de orden fisicoquímico, por intermedio de él tendrían los leucocitos de los animales inmunizados propiedades específicas que los diferenciarían fundamentalmente de sus congéneres comunes.

Pero he querido eliminar totalmente esta posible objeción y para ello he experimentado con los leucocitos de los animales inmunizados en contra del bacilo del carbunco.

Numerosos autores han demostrado que el suero de los conejillos de la India sólidamente vacunados en contra del bacilo del grano malo, no poseen por lo general propiedades preventivas, rara vez es posible transmitir por su intermedio la inmunidad pasiva y eso solo empleando grandes cantidades, a pesar de que el animalito proveedor del suero soporta sin mayores consecuencias muchas dosis mortales de cultivo.

Este hecho señalado por Wernicke (12), Nittis (13), Metchnikoff (14) y otros, lo he podido confirmar en el curso de mi experimentación.

Ensayando los leucocitos de los conejillos de la India sólidamente vacunados en contra del bacilo del carbunco y cuyo suero no era capaz de transmitir la inmunidad pasiva, me convencí que estos fagocitos eran alrededor de ochenta veces más activos que sus similares comunes.

Si inyectamos en el seno de un tumor leucocitario provocado debajo de la piel, por la introducción de leucocitos comunes, necesitamos alrededor de 1.400 millones de esta clase de células para salvar al animalito, de una muerte cierta. En cambio empleando los leucocitos de un animal inmunizado, se consigue el mismo resultado con solo 15 millones de fagocitos.

Estas células, como es lógico suponer, son inyectadas después,

de ser desprovistas de su plasma. Por otra parte este no se manifiesta activo, como lo demuestra la misma experimentación, tanto que los animales inyectados con el bacilo del carbunco, en el seno del edema formado por la introducción subcutánea del plasma, en el cual estaban suspendidas las células, mueren en el mismo tiempo que los testigos o solo con un ligero retardo.

Para ilustrar mejor estas afirmaciones transcribo a continuación algunas de mis experiencias publicadas en otro trabajo (15), las que como se verá son bien elocuentes.

Peso en gramos	Cantidad de leucoci- tos inyectados	Cantidad de cultivo inyectado	Resultado
Ch. N. 1.370	300.000.000	0 01 c. c.	Se salva
Ch. N. 2.390	150.000.000	0 01 c. c.	Se salva
Ch. N. 3.400	60.000.000	0 01 c. c.	Se salva
Ch. N. 4.370	30.000.000	0 01 c. c.	Se salva

El exudado es obtenido de un cobayo sólidamente inmunizado en contra del bacilo del carbunco, es sedimentado para separar las células, las que luego son emulsionadas en solución fisiológica, esta es agregada en la cantidad suficiente para alcanzar el volumen primitivo de líquido. El cultivo empleado es caldo infestado, 24 horas antes de ser utilizado, con bacilo del carbunco.

Vemos que los animalitos se salvan, lo que no pasa con aquellos que reciben el plasma residuo de la sedimentación como puede verse en el cuadro siguiente:

Peso en gramos	Cantidad de plasma inyectado	Cantidad de cultivo inoculado	Resultado
Ch. N. 1.390	10 c. c.	0 01 c. c.	muere en 56 horas
Ch. N. 2.370	5 c. c.	0 01 c. c.	muere en 51 horas
Ch. N. 3.390	2 c. c.	0 01 c. c.	muere en 48 horas
Ch. N. 3.370	1 c. c.	0 01 c. c.	muere en 60 horas

Estos conejillos reciben las cantidades de plasma en la cual estaban suspendidas las células que son inyectadas a los animales de la serie anterior, de modo que cada uno de los números se corresponde. Así por ejemplo el N. 1 de este cuadro recibe 10 c. c. de plasma porque esa es la cantidad en la cual estaban suspendidos los 300 millones de células que son inyectadas al N. 1 de la experiencia anterior. Tanto en la prueba anterior como en esta, los bacilos son inyectados en el seno del tumor formado debajo de la piel por la introducción ya sea de las células o del plasma.

En otras experiencias que no copio para no ser demasiado extenso se demuestra que el límite de acción de los leucocitos inmunizados está entre 10 y 15 millones de células, mientras que el de las comunes llega a la enorme cifra de 1.400 millones.

Esta propiedad no está ligada a la vida de los leucocitos por que aún muertos ellos salvan a los animales, como lo demuestra la siguiente experimentación:

Peso en gramos	Suero inyectado	Células inyectadas	Cantidad de cultivo inoculado	Resultado
Ch. N. 1.270	1 c.c.		0.01 c.c.	muere en 48 horas
Ch. N. 2.270	0.5 c.c.		0.01 c.c.	muere en 50 horas
Ch. N. 3.500		60.000.000	0.01 c.c.	se salva
Ch. N. 4.500		30.000.000	0.01 c.c.	muere en 40 horas
Ch. N. 5.500		15.000.000	0.01 c.c.	se salva
Ch. N. 6.270		30.000.000	0.01 <sup>o</sup> c.c.	se salva

Las células son previamente separadas de su plasma y emulsionadas en solución fisiológica, siendo luego sometidas a dos congelaciones y descongelaciones rápidas y maceradas durante cinco días a la temperatura ordinaria.

Como es lógico suponer tanto ellas como el suero empleado provienen de un conejillo de la India, inmunizado en contra del bacilo del grano malo.

Las inyecciones son efectuadas debajo de la piel, salvo la del N. 4 en el cual las células son introducidas en el peritoneo.

Vemos que los productos son activos a pesar de la muerte de

los fagocitos; pero a condición de que el bacilo se inyecte en íntimo contacto con ellos; nos demuestra también esta experiencia la inocuidad del suero a pesar de haber sido extraído a un animalito vacunado y cuyos leucocitos se muestran activos.

Algunos años después de efectuadas mis experiencias, efectuaron constataciones semejantes Pettersson (16) y Salimbeni (17), el primero con el bacilo del carbunco y con el vibrión de Metchnikoff. Estas últimas fueron confirmadas por el segundo de los autores nombrados; ninguno de ellos citó para nada mis trabajos, los que fueron realizados alrededor de cuatro o cinco años antes que los de estos autores.

Las investigaciones anteriormente mencionadas demuestran evidentemente que los leucocitos de los animales inmunizados adquieren propiedades nuevas que los hacen más aptos para la lucha en contra de los microorganismos.

Es claro que esta propiedad tiene que ser determinada por alguna substancia porque no es posible suponer que ella sea debida a una función "sine materiae" de los leucocitos.

Mediante la investigación ulterior que he efectuado he podido confirmar este modo de ver porque he demostrado en los leucocitos de los animales inmunizados la presencia de una substancia específica que he conseguido aislar y a la cual deben los polinucleares sus propiedades especiales en la inmunidad anti-infecciosa.

Me ha sido posible realizar este descubrimiento que corona la serie de trabajos que vengo efectuando para la demostración de las modificaciones que sufren los leucocitos durante la inmunización, gracias al apoyo entusiasta que he encontrado de parte de las autoridades de la facultad, así como de las de la universidad, las que no han ahorrado esfuerzo para colocar al instituto en condiciones tales, que hoy no tiene nada que envidiar a sus similares. No puedo dejar pasar esta oportunidad sin mencionar en especial al ex decano de la facultad, el Dr. Alejandro Centeno, quien apoyó con toda su autoridad, todos los pedidos que consideré necesarios para

la buena marcha de la institución, pedidos que encontraron la más completa buena voluntad en el rector de aquella época, el Dr. J. Deheza.

Para demostrar la presencia de substancias específicas en los leucocitos de los animales inmunizados me he valido del exudado de chanchitos de la India, vacunados en contra del bacilo de Eberth. El exudado peritoneal era provocado por la inyección de 20 a 30 c. c. de solución de somatosa al 10 o/o, en el peritoneo de los chanchitos, inyección que era practicada la víspera de la extracción leucocitaria y dividida en dos porciones; una de 10 c. c. introducida por la mañana y la otra, con el resto de la cantidad indicada, efectuada por la tarde. La solución de somatosa es esterilizada en el autóclave y toma por este procedimiento un color oscuro, procedimiento que parece facilitar más la acumulación leucocitaria, que la simple esterilización por la ebullición.

Para extraer del conejillo el exudado, en el cual la enorme mayoría de las células son leucocitos polinucleares, es sangrado, lo que permite también el estudio del suero. El exudado inmediatamente después de extraído, es diluido al décimo para principiar a atenuar desde ya la posible acción del plasma del exudado. Luego el exudado es sedimentado. La sedimentación dura 1 minuto, en una centrífuga eléctrica de 4 a 5 mil vueltas por minuto, se separa el líquido, se emulsionan los leucocitos en solución fisiológica, se agitan suavemente para lavarlos, se sedimentan nuevamente y finalmente se emulsionan en solución fisiológica, de modo que se encuentren más o menos 100 millones de células por c. c. Todo este procedimiento no debe durar más de media hora para impedir que los leucocitos sufran demasiado y eliminen sus substancias bactericidas en el medio ambiente.

Una vez emulsionadas definitivamente, las células son sometidas a la congelación y rápida descongelación por tres veces consecutivas, para que cedan al medio ambiente sus elementos microbicidas, luego se colocan en la estufa a 37 durante tres horas, man-

teniéndolas después en la heladera, hasta el momento de emplearlas. Las células y sus restos se decantan y queda sobrenadando un líquido albuminoso, ligeramente citrino, que es el elemento que me ha servido en el curso de mi experimentación.

Primeramente había que determinar si el producto así obtenido tenía propiedades bactericidas, para lo cual lo inyecté en proporciones variadas en el peritoneo de conejillos de la India, los que inmediatamente después eran infestados conjuntamente con un testigo, con una dosis mortal de cultivo en caldo de 24 horas de edad, del acilo de Eberth. Bacilo cuya virulencia había sido aumentada previamente mediante pasajes sucesivos, en el peritoneo de cobayos, teniendo cuidado de no efectuar la siembra directamente del exudado en el medio de cultivo, sino cultivar previamente el mismo líquido del exudado y recién después de esto sembrar su agar para examinar el estado de pureza y luego en caldo para inocular nuevamente. Procediendo de este modo he conseguido, rápidamente exaltar la virulencia de los bacilos recién extraídos del organismo del hombre enfermo. El cultivo empleado era de mediana virulencia, un sexto de c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad mataba los cobayos en un día; he tomado para mi experimentación siempre una dosis mayor, un cuarto de centímetro cúbico, que mata los conejillos en un lapso de tiempo de 18 a 20 horas.

El resultado obtenido en esta experimentación, como puede verse en el cuadro N. 1, demuestra sin dejar lugar a dudas que, el extracto de leucocitos inmunizados tiene francas propiedades preventivas.

A la hora de efectuada la infección, se extrae líquido peritoneal y se observa lo siguiente: en el N. 1, se encuentran muy pocos bacilos, pocos leucocitos especialmente representados por linfocitos.

El cuadro observado en los N. 2 y 3 es muy semejante.

En el número 4, se observan muchos bacilos aislados y móvi-

les, bastante leucocitos entre ellos, muchos polinucleares, no hay fagocitosis.

CUADRO N° 1

Ch. 1	500	0.28 c. c. de extracto leucocitario en el peritoneo	1/4 de c. c.	se salva
Ch. 2	gra-	0.18 c. c. de extracto leucocitario en el peritoneo	de cultivo en caldo de 24 horas de	se salva
Ch. 3	mos	0.09 c. c. de extracto leucocitario en el peritoneo	edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	se salva
Ch. 4	de	Testigo		amanece muerto
	peso			

A las dos horas de efectuada la infección en los animales Ns. 1, 2, y 3, ha disminuido notablemente la cantidad de bacilos y habiendo aumentado los leucocitos especialmente los polinucleares, algunos de los cuales han fagocitado uno que otro de los pocos microorganismo existentes. En el líquido peritoneal del N. 4, han aumentado mucho los bacilos, también algo los polinucleares; pero a pesar de encontrarse en presencia de muchos bacilos y leucocitos, la fagocitosis es muy rudimentaria.

Cinco horas después de iniciada la infección en los animales núms. 1, 2 y 3 se observa solamente uno que otro báculo, habiendo aumentado mucho los polinucleares especialmente en los números 2 y 3, la fagocitosis dada la escasísima cantidad de microbios es muy reducida.

En el exudado del N°. 4, se encuentran gran cantidad de bacilos, móviles, libres y aislados, bastantes leucocitos polinucleares, pero la mayoría de ellos se encuentran reunidos en grupos más o menos grandes, como lo efectúan siempre que sufren, la fagocitosis muy rudimentaria.

Dos horas después, no es posible encontrar microscópicamente bacilos, en el líquido peritoneal de los chanchitos números 1, 2, 3, solo se observan gran cantidad de leucocitos, mientras que en el número 4 se encuentra una enorme cantidad de bacilos y a pesar de encontrarse también muchos leucocitos, estos que están reunidos en grupos, no fagocitan, cuadro que demuestra la intensidad de la infección peritoneal de este animalito.

Esta experiencia nos demuestra pues, la presencia de sustancias anti-infecciosas en el líquido que ha servido para la inyección y llama la atención que al principio de la infección se encuentren en el peritoneo, casi exclusivamente los linfocitos y que la acción más manifiesta es un retardo de la multiplicación de los bacilos, los que no aumentan el número con la facilidad que sucede en el testigo; los polinucleares entran recién en acción a las dos horas de efectuada la infección.

En la siguiente experiencia, se trata de dosar el producto leucocitario, para lo cual se inyectan conejillos de la India con cantidades decrecientes del producto en ensayo.

CUADRO N° 2

Ch. N. 1	500	0.090 de extracto leucocitario peritoneal	Se inyectan con 1/4 de	Se salva
Ch. N. 2	gra-	0.045 de extracto leucocitario peritoneal	c. c. de cultivo en caldo	Se salva
Ch. N. 3	mos	0.029 de extracto leucocitario peritoneal	de 24 horas de edad del	Amanece muerto
Ch. N. 4	de	testigo	bac. de Eberth	Amanece muerto
	peso			

Tanto la inyección, como la infección son peritoneales, ésta última se efectúa inmediatamente después de la primera.

A la hora de efectuada la infección, se extrae líquido peritoneal, constatándose en el del N°. 1, uno que otro bacilo, pocos leucocitos, en su mayoría linfocitos, fagocitosis casi nula. En el exudado del N°. 2 se encuentran algunos leucocitos, con predominio de polinucleares, más microorganismos que en el número 1, fagocitosis casi nula. En el líquido peritoneal extraído al N°. 3 se observa un cuadro parecido; en cambio en el peritoneo del N°. 4 se encuentran bastantes bacilos, pocos leucocitos, con predominio de polinucleares, fagocitosis casi nula.

A las dos horas y media de iniciada la infección se nota ya, claramente la diferencia debida a la menor cantidad de producto leucocitario inyectado.

En el líquido peritoneal del N°. 1 no se observan microorganismos, en cambio se ven muchos leucocitos, en su mayoría polinucleares. En el exudado del N°. 2, se observan pocos bacilos, los que no se ven en todos los campos microscópicos, se encuentran bastantes leucocitos, la mayoría polinucleares, fagocitosis rudimentaria. En el líquido extraído al N°. 3, la cantidad de bacilos es mayor que en los anteriores, se observan varios en cada campo microscópico y han tomado el tipo francamente animalizado, se encuentran también bastante leucocitos, la mayoría polinucleares, fagocitosis rudimentaria.

En el N°. 4, se encuentran bastantes bacilos y pocos leucocitos, con fagocitosis poco desarrollada.

Seis horas después de iniciada la infección, las diferencias de la marcha de ella, en los diferentes animalitos infestados es muy clara y en su ulterior desarrollo se muestra evidente la acción de la cantidad de producto leucocitario inyectado.

En el líquido peritoneal del N°. 1 no se ven bacilos, solo se observan leucocitos polinucleares y bastantes hematias, que se han acumulado en la cavidad peritoneal a causa de una pequeña hemorragia efectuada, en una de las funciones anteriores. En el exudado del N°. 2, se ve gran cantidad de polinucleares, algunos bacilos

libres, los más formando pequeños grupos, coloreándose en forma de navicilla; fagocitosis poco acentuada, llamando en este caso la atención, lo mismo que en los demás, que son pocos los leucocitos que fagocitan, la mayoría no lo hace; pero los pocos que han incluido bacilos tienen por lo general muchos de ellos.

En el exudado del N°. 5, se ven muchos bacilos, bastantes leucocitos y fagocitosis casi nula.

En el líquido peritoneal del N°. 4, se encuentra una enorme cantidad de bacilos libres y bien móviles, bastantes leucocitos, los más reunidos en grupos, fagocitosis casi nula.

Dos horas después de esta última observación, la marcha definitiva de la infección está definida y se evidencia por el examen del exudado de los animalitos. En el líquido del peritoneo del N°. 1, no se notan mayores diferencias a lo encontrado en la observación anterior, fuera de uno que otro núcleo de los polinucleares se encuentra en aparente cariólisis.

En el exudado del N°. 2, se encuentran gran cantidad de leucocitos, muy pocos bacilos, tanto que hay que recorrer varios campos para encontrar alguno, uno que otro polinuclear con bastantes microorganismos fagocitados.

En el líquido peritoneal extraído al N°. 3, se encuentran gran cantidad de bacilos, libres y bien móviles, muchos leucocitos, los más reunidos en grupos más o menos grandes, fagocitosis muy poco pronunciada.

En el N°. 4 se encuentra una enorme cantidad de bacilos bien móviles y libres bastantes leucocitos, los más reunidos en gran número, formando pequeños grupos, visibles a simple vista, fagocitosis casi nula.

Vemos pues, que la dosis menor capaz de salvar a un conejillo de la India de la infección mortal para el testigo, es de 0.45 c. c. si bien con cantidades menores se consigue refrenar la marcha de la enfermedad por algunas horas, pero ella, a pesar de todo, toma cuerpo y terminando el proceso con la muerte del animalito.

Estas experiencias nos demuestran que los productos leucocitarios obtenidos de polinucleares provenientes de animales inmunes, son francamente preventivos; pero no nos demuestran en manera alguna que la sustancia bactericida solo exista en ellos, hay que comparar su acción con los productos similares obtenidos de los leucocitos de animales vírgenes de inmunización, para poderlo asegurar.

Muchos autores nos han demostrado que los leucocitos y sus extractos tienen fuertes propiedades bactericidas y para no citar sino a los más modernos, mencionaré los trabajos de Schneider (18), quien colocando a los polinucleares en una solución de suero al 5 0/0, consigue productos fuertemente microbicidas, bautizando a la substancia causante de esta propiedad, con el nombre de leuquina y a los de Petterson (19) y algunos de sus colaboradores, quienes estudian los productos bactericidas de los leucocitos, los que al decir de ellos no son eliminados fácilmente al medio ambiente, sino que actúan en el interior de los polinucleares, razón por la cual les denominan endolisinas.

Pues bien, estudiando comparativamente los extractos de leucocitos provenientes de animales inmunizados y los de otros vírgenes de inmunización, se nota una diferencia a favor de los primeros, pero poco marcada como puede observarse en los siguientes cuadros:

CUADRO N° 3

Ch. N° 1	300	0.045 de extracto de leucocitos inmunes Inyección peritoneal	1/4 de c. c. de cultivo	se salva
Ch. N° 2	gra-	0.050 de extracto de leucocitos vírgenes Inyección peritoneal	en caldo de	amanece muerto
	mos		24 horas de edad de bac.	
Ch. N° 3	de	testigos	Eberth peritoneal	amanece muerto
	peso			

Todas las inyecciones e infecciones son efectuadas en el peritoneo.

Tanto los leucocitos provenientes de animales inmunizados, como aquellos vírgenes, de este proceso, sufren el mismo tratamiento ya mencionado.

Se extrae líquido peritoneal a la hora de iniciada la infección, en el del N°. 1 se encuentran muy pocos bacilos, algunos con señales de destrucción extra-celular, fagocitosis poco acentuada, sin embargo se ve uno que otro leucocito con muchos bacilos fagocitados. En el N°. 2 se encuentran muchos bacilos, pocos leucocitos, los más reunidos en grupos, fagocitosis casi nula.

En el N°. 3 se encuentran mayor cantidad de bacilos y muy pocos leucocitos.

Un resultado semejante puede observarse en la siguiente experiencia:

CUADRO N° 4

Ch. N° 1	300	0.05 extracto de leucocitos vírgenes en el peritoneo	1/4 de c. c.	amanece muerto
Ch. N° 2	mos	0.05 extracto de leucocitos inmunizados en el peritoneo	de cultivo en caldo del bacilo de	se salva
Ch. N° 3	de peso	testigo	Eberth peritoneal	amanece muerto

Sin embargo la diferencia no es muy marcada, pues que con la dosis doble de la anteriormente empleada, el extracto, de leucocitos provenientes de animales vírgenes de inmunización, salva a los animales, como puede observarse en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 5

Ch. N° 1	500 gra- mos	0.1 de extracto de leucocitos vírgenes en el peritoneo	1/4 de c. c. de cultivo del bac. de Eberth en el peritoneo	se salva
Ch. N° 2	de peso.	testigo	cultivo de 24 horas de edad	amanece muerto

Los leucocitos han sufrido el mismo tratamiento de todos los demás. Inyecciones peritoneales.

A la hora de efectuada la inyección, se extrae líquido peritoneal, en el exudado del N°. 1, se encuentran pocos bacilos, bastantes leucocitos, la mayoría polinucleares, fagocitosis bastante pronunciada. En el N°. 2, muchos bacilos, libres y bien móviles, bastante leucocitos, fagocitosis nula.

A las tres horas de iniciada la infección, en el exudado peritoneal del N°. 1 se encuentran muy pocos bacilos, bastantes leucocitos, algunos polinucleares con fagocitosis acentuada. En el N°. 2 sigue su curso la infección.

Seis horas después de iniciada la inyección, en el exudado del N°. 1 no se ven casi microorganismos y en cambio se encuentran gran cantidad de leucocitos, solo recorriendo varios campos es posible encontrar algún polinuclear con bacilos fagocitados.

En el N°. 2 se observan gran cantidad de bacilos móviles y libres, aislados, pocos leucocitos y fagocitosis nula.

Se ve pues, que las endolisinas comunes tienen también una enérgica acción preventiva aunque manifiestamente menor que la de los productos de leucocitos inmunes, pero lo suficiente como para no hacer resaltar en absoluto la eficacia de estos últimos.

En esta experiencia resalta también el hecho, de que entre los leucocitos del exudado, son relativamente pocos, los que fagocitan, a pesar de ser la enorme mayoría de ellos polinucleares, y encon-

trarse todos en condiciones aparentemente iguales. Este hecho haría suponer que entre los fagocitos hay algunos que son más aptos que otros para efectuar el englobamiento de los microorganismos.

Para tratar de dilucidar a ciencia cierta si realmente los productos leucocitarios proveniente de animales inmunizados, gozan de propiedades especiales, carente en los comunes, traté de hacer más severa la experimentación, para lo cual, he empleado estos elementos como curativos, inyectándoles en el peritoneo de los chanchitos a la hora de iniciada la infección. En estas experiencias como podrá verse, en los cuadros subsiguientes, se marca más francamente la ventaja a favor de los leucocitos inmunizados.

CUADRO N° 6

Ch. N° 1	500	A las 9.15	A las 10.15 a. m. se le inyecta 0.5 de extracto de leucocitos vírgenes	amanece muerto
Ch. N° 2	gramos de	se les inocula con 1/4 c.c. de cultivo en caldo del	A las 10.15 a. m. se le inyecta 0.5 de extracto de leucocitos inmunes	amanece muy enfermo, muere a la 1 p. m.
Ch. N° 3	peso	bac. Ebe.	testigos	amanece muerto

Los extractos leucocitarios son obtenidos por el procedimiento ya mencionado.

Tanto la infección como las inyecciones son efectuadas en el peritoneo.

Después de la inyección de productos leucocitarios el N° 2 mejora notablemente, en las preparaciones del líquido peritoneal se nota una intensa leucocitosis con fagocitosis muy pronunciada, y marcada disminución del número de bacilos, si se le compara

con los que contiene el N°. 1, en el cual la infección parece seguir su curso, sin notarse mejoría en el animalito.

Hasta las 5 de la tarde el número de bacilos en el peritoneo del N°. 2 se mantiene más o menos constante, notándose, por lo tanto, una franca acción frenadora, sobre su multiplicación, mientras que en el N°. 1 y en el testigo el número de bacilos aumenta enormemente. Después de esa hora, los microbios aumentan también en el N°. 2 y más que nada se nota que la fagocitosis disminuye y que los leucocitos principian a reunirse en grupos, como lo efectúan siempre que dan muestras de sufrimientos.

Vemos pues, que en condiciones más enérgicas, los productos leucocitarios obtenidos de leucocitos provenientes de animales inmunizados, se muestran de una acción más intensa que los productos similares conseguidos con esta misma clase de células extraídas a animales vírgenes de inmunización, por más que, en el caso presente la dosis empleada no es suficiente para salvar el animal, pero siempre se nota la mayor acción en el retardo que sufre la muerte de él y en la evidente acción frenadora, efectuada durante las primeras horas de infección; fenómenos carentes en el animalito inyectado con el producto obtenido de los leucocitos vírgenes de inmunización.

CUADRO N° 7

Ch. N° 1	300	A las 9 a. m. se les inyecta 1/4 c. c. de cultivo en	A las 10 a. m. se le inyecta peritonealmente 0.58 extracto leuco. virgen.	muere en 24 horas
Ch. N° 2	mos	caldo de 24 horas de edad del bacilo de	A las 10 a. m. se le inyecta peritonealmente 0.58 de extracto de leucocitos inmunizados	muere en 50 horas
Ch. N° 3	de	cilico de Eberth en el peritoneo	testigo	amanece muerto
	peso			

Aumentando las dosis, esas diferencias se hacen más notables, pero el resultado final, no es lo suficientemente claro como para hacer resaltar en absoluto la mayor acción de las células provenientes de animales inmunizados.

Los productos empleados son los mismos de la experiencia anterior.

Tanto las inyecciones como las infecciones se efectúan en el peritoneo.

Al número 2, se le sale el recto, 24 horas después de iniciada la infección.

En el líquido extraído a la hora de efectuada la inyección del extracto leucocitario, se observa en el exudado del N°. 1 muchos bacilos, algunos leucocitos y fagocitosis casi nula.

En el líquido extraído al N°. 2 se encuentran bastantes bacilos, bastantes leucocitos, encontrándose la fagocitosis regularmente acentuada, muchos son los polinucleares que contienen microorganismos; pero en pequeña cantidad cada uno de ellos, como si la acción fagocitaria fuese más general.

A las ocho horas, de efectuada la infección, es decir a las siete de la inyección leucocitaria, se observa en el líquido peritoneal del N°. 1, enorme cantidad de bacilos libres, móviles, que en las preparaciones teñidas por la Thionina fénicada, toman una coloración violeta muy marcada, coloración que se observa siempre que los bacilos reaccionan enérgicamente en contra de las acciones nocivas que encuentran en el peritoneo. Al lado de ellos se encuentran pocos leucocitos, pero con fagocitosis intensa.

En el exudado peritoneal del N°. 2, se encuentra una regular cantidad de bacilos, mucho menos de los que se observan en el N°. 1, regular cantidad de leucocitos y fagocitosis regularmente desarrollada.

Al día siguiente de efectuada la infección, se nota en el exudado del N°. 2, gran cantidad de leucocitos, muchos bacilos y una fagocitosis sumamente pronunciada, la mayoría de los polinuclea-

res están repletos de microorganismos, lo mismo acontece con los mononucleares, los bacilos se encuentran en todo grado de digestión.

En la autopsia del N°. 1 se encuentra el cuadro habitual de la peritonitis séptica, con enorme cantidad de bacilos, pocos leucocitos, todos en leucolisis y pocas falsas membranas, en el borde hepático y en el epiplón.

Aumentando aún la dosis de productos leucocitarios, se consigue refrenar en absoluto la infección en el animalito que recibe el producto leucocitario immune; pero aquel que es inyectado con las endolisinas comunes, si bien se enferma gravemente, acaba sin embargo por salvarse, como puede observarse en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 8

Ch. N° 1	300	A las 9 a. m. se les inocula 1/4 c. c. de cultivo en	A las 10 a. m. 0.55 c. c. de extracto leucocitario obtenido de leucos virgenes, peritoneal	Se enferma gravemente pero, se repone y se salva
Ch. N° 2	mos	caldo de 24 horas de edad del bacilo de	A las 10 a. m. 0.55 c. c. de extracto leucocitario obtenido de leucos inmunizados peritoneal	No sufre absolutamente de nada
Ch. N° 3	de peso	Eberth en el peritoneo	testigo	Amanece muerto

Los elementos empleados son los mismos de la experiencia anterior.

A las 11.30 a. m. se extrae líquido peritoneal a los animalitos, observándose el del N°. 1 regular cantidad de bacilos, muchos leucocitos, fagocitosis acentuada. En cambio en el N°. 2 se encuentra muy raros bacilos, muchísimos menos que en el N°. 1 bastante leucocitos, en menor número también que en el animalito anteriormente observado, pero en cambio se nota una fagocitosis muy enérgica.

pocos leucocitos contienen bacilos, pero ellos están completamente repletos. En el N.º 3, se encuentran gran cantidad de bacilos, pocos leucocitos y poca fagocitosis.

A las siete horas le efectuada la inyección de productos leucocitarios, encontramos en el exudado peritoneal de los infectados el siguiente cuadro: N.º 1, gran cantidad de bacilos libres y móviles muchos leucocitos, aislados con fagocitosis bastante pronunciada, cuadro que demuestra una activa defensa. En N.º 2 el exudado es puriforme, con enorme cantidad de leucocitos, no se ven microorganismos, la infección está completamente dominada.

En el N.º 3, se encuentra una enorme cantidad de microorganismos, muy móviles que cruzan rápidamente el campo microscópico en todas direcciones, pocos leucocitos, fagocitosis casi nula.

A las 24 horas en el exudado del N.º 1 que es francamente puriforme se observan gran cantidad de leucocitos, algunos bacilos libres, fagocitosis muy acentuada, se encuentran también bastantes macrófagos con fagocitos incluidos en su interior.

En el N.º 2, apenas es posible extraer una pequeña gota de pus espeso, constituido por enorme cantidad de polinucleares, muchos macrófagos con leucocitos incluidos, no se ven bacilos ni extra ni intracelulares.

En ambas experiencias se nota pues, una acción más enérgica, más evidente de los extractos leucocitarios inmunes; pero no lo suficientemente amplia en su diferenciación como para llevar completa convicción al espíritu. Había que buscar elementos de juicio más convincentes, sino quedaría la solución buscada como una mera hipótesis no bien demostrada.

Para ello traté de destruir las endolisinas, con la esperanza de que el cuerpo que suponía formado durante la inmunización, pudiese escaparse a ella y aparecer con todo su poder sin ser enmascarado en su acción por los elementos bactericidas, comunes de los leucocitos.

Después de algunos ensayos infructuosos sometí los productos leucocitarios a la influencia de la calefacción. Las endolisinas soportan temperaturas altas, mucho mayores que las substancias similares del suero. Desde los trabajos de Buchner (20) y Schattentfroh (21), hasta los de Petterson (22) y Kling (23) se ha demostrado que los productos leucocitarios pierden sus propiedades a una temperatura mayor que la de 56 a 60, en que desaparece la acción microbicida del suero. Estos últimos autores, que son los que más recientemente han estudiado la propiedad bactericida de los extractos leucocitarios, han demostrado que la endolisinas recién pierden sus propiedades por la calefacción a 75° mantenida durante media hora.

He sometido mis productos, previa dilución, para impedir su coagulación, a la influencia de esa temperatura, mantenida durante 30 minutos, obteniendo, como puede verse en los cuadros adjuntos, un amplio resultado, que demuestra la presencia en los leucocitos de animales inmunizados de un producto que resiste a esa temperatura y que es francamente bactericida, producto que no existe en la misma clase de células provenientes de animales vírgenes de inmunización.

CUADRO N° 9

Ch. N° 1	500	A las 9 a. m. se les inocula con 1/4 c. c. de cultivo en caldo	A las 10 a. m. inyección de extracto de leucocitos vírgenes calentado a 75°, en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 2	mos	de 24 horas de edad del bacilo de	A las 10 a. m. inyección de extracto de leucocitos inmunes calentado a 75°, en el peritoneo	Muere a las 11 a. m.
Ch. N° 3	de peso	Eberth en el peritoneo	testigo	Amanece muerto

De los extractos leucocitarios se toma un centímetro cúbico de cada uno de ellos y previa dilución se colocan en la estufa seca, a 75°. durante 40 minutos para que permanezcan alrededor de media hora a la temperatura deseada.

Se forma en ambos un ligero precipitado, que es emulsionado, antes de efectuar las inyecciones, las que como siempre son peritoneales.

Como puede verse, con la dosis empleada si bien el resultado final no es satisfactorio, porque muere también el animalito inyectado con el producto de los leucocitos inmunes, esto se muestra, sin embargo más activo, más enérgico que el extracto de las células similares comunes.

CUADRO N° 10

Ch. N° 1	300	A las 9 a. m.	A las 10 a. m. 0.55 de extracto de leucocitos vírgenes calentados a 75°, en el peritoneo	Muere en 24 horas
Ch. N° 2	mos	1/4 c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de	A las 10 a. m. 0.50 de extracto de leucocitos inmunes calentados a 75°, en el peritoneo	Se salva
Ch. N° 3	de	Eberth peritoneal	testigos	Amanece muerto
	peso			

En cambio en el cuadro siguiente en el cual los cobayos reciben dosis mayores, el resultado es franco y no deja lugar a dudas, de la presencia de sustancias especiales en los leucocitos inmunes, carentes en los comunes.

Los extractos preparados son los mismos que los de la experiencia anterior y sus inyecciones son efectuadas en el peritoneo.

Hora y media después de la inyección leucocitaria, se extrae líquido y en el exudado del N°. 1 se observa el siguiente cuadro:

bastante bacilos, los más móviles y libres, algunos reunidos formando pequeños grupos, bastante leucocitos, entre ellos regular cantidad de linfocitos, uno que otro polinuclear con uno o dos bacilos incluidos. En el exudado del N.° 2, se encuentra menos cantidad de bacilos, bastantes leucocitos, también en menor cantidad, que en el animalito anteriormente examinado; pero en cambio la fagocitosis está pronunciada, algunos leucocitos se encuentran repletos de bacilos.

En el N.° 3 se encuentran muchos microorganismos, pocos leucocitos y fagocitosis casi nula.

Por la tarde a las cinco horas de efectuada la introducción de los elementos leucocitarios, se observa en el líquido peritoneal extraído al N.° 1, gran cantidad de bacilos libres, bien móviles y aislados, bastantes leucocitos los más reunidos en grupos y fagocitosis muy poco acentuada. En cambio en el N.° 2 se ven pocos bacilos, gran cantidad de leucocitos y fagocitosis bastante marcada. Dos horas después de esta última observación, el exudado peritoneal de los animalitos presenta el siguiente cuadro: N.° 1, enorme cantidad de bacilos que cruzan rápidamente el campo microscópico, algunos hematies, muy pocos leucocitos; pero la mayoría de ellos con fagocitosis acentuada. En el exudado del N.° 2, aún se observan bastantes bacilos; pero en cantidad mucho menor que en el N.° 1, enorme cantidad de leucocitos, con regular fagocitosis. En el N.° 3 enorme cantidad de bacilos, uno que otro leucocito.

Al día siguiente, en la autopsia del testigo y del N.° 1 se encuentran, en el líquido peritoneal, enorme cantidad de bacilos y muy pocos leucocitos con fagocitosis acentuada. En el N.° 1 existen mayor cantidad de pseudo-membranas, en el borde hepático y en el epiplón que en el N.° 3.

El exudado extraído al N.° 2, francamente purulento, en él se encuentra enorme cantidad de leucocitos aislados, la mayoría polinucleares, todos ellos con fagocitosis muy acentuada, con gran cantidad de bacilos incluidos los que se encuentran en diferente grado

de digestión; se observa también uno que otro microorganismo libre.

Vemos, pues, que aumentando la dosis se consigue salvar a los animalitos inyectados con el producto leucocitario obtenido con los leucocitos inmunizados, a pesar de haberseles sometido a la calefacción de 75° durante media hora, tratamiento que destruye casi totalmente la acción de los extractos conseguidos mediante polinucleares vírgenes de inmunización; es decir que este tratamiento destruye las endolisinas, pero no los productos que se forman en los leucocitos por efecto del proceso de la vacunación. Sin embargo el tratamiento mencionado no destruye del todo las endolisinas, por que estas después de haber sufrido la calefacción se conservan ligeramente activas, tanto que los animalitos inyectados con ella mueren con retardo sobre los testigos.

Para llegar a una destrucción completa, para hacer más evidente, más intensa, la diferencia de ambas clases de productos, recurrí a la calefacción, colocándome en las mismas condiciones anteriores, pero en presencia de una pequeña cantidad de gelatina. Petterson, en sus estudios sobre las endolisinas, nos ha demostrado que ellas son absorbidas por ciertos coloides, entre otros por la gelatina; es por esta causa que combiné ambas acciones, para tratar de conseguir la destrucción completa de la acción de los productos leucocitarios comunes. Este fin fué conseguido con todo éxito como puede verse en el cuadro siguiente. (N°. II).

De los extractos leucocitarios se toman 0.5 c. c. de cada uno y mezclan, en tubos separados, cada uno con un centímetro cúbico de solución fisiológica, a la cual se le agrega 0.1 c. c. de gelatina común de cultivo, previamente fluidificada. Las mezclas se colocan en la estufa seca a 75° durante 40, para que las mezclas puedan permanecer a la temperatura deseada durante media hora.

El número dos de esta serie se enferma más rápidamente que el número uno, pero reacciona prontamente mejorando rápidamente.

CUADRO N.º 11

Ch. N.º 1	300	A las 9 a. m. se le inyecta 1/4 c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth, en el peritoneo	A las 10 a. m. se le inyecta 0.5 de extracto de leucocitos vírgenes calentados con gelatina, en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N.º 2	gramos de		A las 10 a. m. se le inyecta 0.5 de extracto de leucocitos inmunes calentados en gelatina, en el peritoneo	Se salva
Ch. N.º 3	peso		Testigo	Amanece muerto

te, tanto que al caer la tarde, cuando los otros animalitos están gravemente enfermos, él está aparentemente sano.

A la hora y media de efectuada la inyección leucocitaria, se extrae líquido peritoneal y se observa en el N.º 1 regular cantidad de bacilos, bastantes leucocitos, fagocitosis muy poco pronunciada; en el N.º 2 el exudado contiene muchos leucocitos, la mayoría aislados, muy pocos bacilos, más bien dicho uno que otro fagocitosis muy acentuada; pero son pocos los leucocitos que contienen microorganismos incluidos pero ellos están repletos de bacilos, los que se encuentran en todo grado de digestión, uno que otro de los microorganismos muestra señales de degeneración extracelular.

En el testigo el número de bacilos existentes es grande, se encuentran también algunos leucocitos, con fagocitosis bastante acentuada en pocos de ellos.

El líquido extraído por la tarde a la seis horas después de efectuada la inyección leucocitaria, tiene los siguientes caracteres: N.º 1 líquido de aspecto grumoso, muchos leucocitos, la mayoría reunidos en pequeños grupos, que son los que le dan el aspecto macroscópico al exudado, muchos bacilos libres, aislados y bien móviles, fagocitosis poco pronunciada, algunos leucocitos en leucolisis.

y otros con principio de cariólisis. En el N.º 2 el líquido extraído es seropurulento, contiene grandes cantidades de leucocitos, casi todos aislados, pocos de ellos formando pequeños grupos, se ven muy pocos bacilos, uno que otro leucocito con fagocitosis.

Dos horas después el N.º 1, lo mismo que el testigo, están francamente enfermos. Examinado el líquido peritoneal de ellos se encuentra que el número de bacilos ha aumentado mucho, en cambio los leucocitos han disminuido, los que en su gran mayoría están agrupados, presentándose algunos de ellos en las preparaciones teñidas por la Thionina, con los núcleos mal coloreados, fagocitosis nula. El N.º 2 se encuentra aparentemente sano, el líquido peritoneal es puriforme, en él se observan enormes cantidades de leucocitos, aislados la mayoría, solo se ve uno que otro bacilo y buscando con empeño se encuentra algún leucocito con fagocitosis.

El testigo contiene grandes cantidades de bacilos, bastantes leucocitos, los más reunidos en grupos, con fagocitosis poco desarrollada.

En la experiencia siguiente se observa un resultado en todo idéntico a la anterior.

CUADRO N° 12

Ch. N° 1	300	A las 9 a. m. se les inocula con 1/4 c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	A las 10 a. m. se le inyecta 0.5 de extracto leucocitario virgen, en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 2	mos		A las 10 a. m. se le inyecta 0.5 extracto de leucocitos inmunes, en el peritoneo	Se salva
Ch. N° 3	de peso		testigo	Amanece muerto

Los productos leucocitarios sufren idéntico tratamiento que los de la experiencia anterior.

En esta prueba, lo mismo que en todas las anteriores, el animalito que recibe el extracto de leucocitos inmunes, se enferma antes que los testigos, se nota sobre todo, una reacción peritoneal bastante intensa, el vientre elevado y muy doloroso al tacto, pero así como se enferma antes, reacciona también prontamente, tanto que cuando los otros principian a sentirse francamente enfermos él está muy mejorado, para aparecer sano poco tiempo después, cuando en los testigos está ya decidida la marcha fatal de la enfermedad.

El exudado extraído a la hora y media de efectuada las inyecciones leucocitarias muestra en el N.° 1 el siguiente cuadro: gran cantidad de bacilos bastantes leucocitos, fagocitosis muy poco acentuada. En el N.° 2 se encuentran muy pocos bacilos, regular cantidad de leucocitos, con discreta fagocitosis. En el testigo encontramos un cuadro semejante al del N.° 1 pero con menos leucocitos. Por la tarde a las 5 p. m. en el líquido peritoneal del N.° 1 se encuentra una enorme cantidad de bacilos, muy pocos leucocitos y fagocitosis nula, en cambio en el N.° 2 solo se ve uno que otro microorganismo y gran cantidad de polinucleares, es lógico que dada la pequeña cantidad de bacilos existentes, sea también muy pequeña la fagocitosis. En el testigo el cuadro observado es casi idéntico al del N.° 1.

Queda, pues, demostrado que por intermedio de la acción combinada de la calefacción mantenida durante media hora a 75° y la absorción por intermedio de la gelatina, se puede privar a los extractos obtenidos de leucocitos comunes, de todo su poder bactericida, al extremo que los animalitos infectados con este producto con el fin de curarlos de una infección en marcha, mueren al mismo tiempo que los testigos. La observación de la marcha de la enfermedad efectuada por intermedio del examen del líquido peri-

itoneal, no muestra diferencias sobre la del testigo, el proceso no es refrenado en ningún momento.

---

En cambio, sometiendo los extractos leucocitarios obtenidos de leucocitos inmunes al mismo tratamiento que sus similares comunes, ellos no sufren alteración en su acción bactericida, quedan casi tan activos como antes de la calefacción y de la absorción por intermedio de la gelatina; ellos refrenan, dominan a la infección peritoneal de los cobayos en pocas horas, salvando a los animalitos de una muerte cierta para los testigos o para aquellos que solo reciben las endolisinas sometidas a igual tratamiento.

Este hecho nos demuestra evidentemente, sin dejar lugar a dudas de ninguna especie, que los leucocitos de los animales inmunizados gozan de propiedades especiales que los diferencian fundamentalmente de los comunes, propiedades que los hacen más aptos para la lucha contra los microbios, propiedad debida a una substancia, bastante estable y que puede fácilmente ser obtenida "in vitro".

Se podría objetar a estas experiencias que por el tratamiento previo a que se someten los leucocitos, no se consigue extraer todo el anticuerpo plasmático, humoral, el cual en los casos de inmunidad científica aumenta considerablemente, acumulándose en grandes cantidades en los humores del organismo.

El cálculo me ha demostrado que, en el peor de los casos, quedaría como residuo del plasma en la cantidad de producto leucocitarios inyectado, solamente 0.000.02 c. c. Para eliminar la duda de que pudiesen ser estos restos plasmáticos los causantes de la actividad del extracto de leucocitos, he inyectado animalitos con más que el doble de esa cantidad, es decir 0.000.05, sin conseguir salvarlos; ellos mueren en el mismo tiempo que los testigos, como puede verse en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 15

Ch. N° 1	300	A las 9 a. m. se les inocula con 1/4 c. c. de cultivo en caldo del bacilo de Eberth de 24 horas de edad en el peritoneo	0.045 c. c. de extracto de leucocitos inmunes en el peritoneo	Se salva
Ch. N° 2	gramos		0.000.05 de plasma de exudado inmune, en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 3	de peso		testigo	Amanece muerto

El extracto leucocitario y el plasma son inyectados momentos antes de la infección. El plasma es del mismo exudado del cual se obtuvieron las células para preparar el extracto que se utiliza en esta experiencia.

Dos horas después de efectuada las inyecciones se extrae líquido peritoneal, observándose en el exudado del N.° 1 pocos bacilos, muchos leucocitos, la mayoría polinucleares y fagocitosis acentuada. En el exudado del N.° 2 se encuentran muchos bacilos, pocos leucocitos y fagocitosis nula; cuadro parecido se observa en el N.° 3, en el cual la fagocitosis es rudimentaria, pero siempre mayor que en el N.° 2.

Por la tarde a las siete horas, de iniciada la experimentación, el examen del exudado peritoneal de los animalitos, da el siguiente resultado: En el N.° 1 se encuentran muchos leucocitos, la mayoría aislados, solo se observa uno que otro bacilo, hay que recorrer varios campos microscópicos para encontrar alguno, fagocitosis casi nula.

En el N.° 2 y en el testigo se observan enormes cantidades de bacilos, libres y móviles que recorren velozmente el campo de la preparación; algunos leucocitos reunidos en pequeños grupos, po-

cos de ellos con los nucleos mal tenidos en las preparaciones coloreadas por la Thionina fenicada; fagocitosis poco desarrollada.

Este ensayo, nos demuestra bien a las claras que el plasma del exudado no puede ser, en manera alguna, el causante de la acción bactericida que demuestran tener el extracto de leucocitos inmunizados, porque inyectándolo en cantidades mucho mayores de las que pueden quedar como residuo en el extracto empleado, el animalito en experiencia no reacciona de diferente modo que el testigo, muere como si no hubiese recibido elemento alguno, capaz de refrenar la acción de los bacilos. La causa pues, que salva a los animalitos inyectados con productos leucocitarios, de una muerte segura, es la substancia extraída por intermedio del extracto a los leucocitos inmunizados y en manera alguna, posibles residuos de plasma o de anticuerpos humorales.

CUADRO N° 14

Ch. N° 1	300	Se le inyecta con 0.000,1 de suero antitífico y 0.05 extracto inmune	Inmediatamente después son inoculados todos con 1/4 c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	Se salva
Ch. N° 2	gramos	Se le inyecta con 0,0001, de suero antitífico		Amanece muerto
Ch. N° 3	de	Se le inyecta con 0.05 de extracto de leucocitos inmunes		Se salva
Ch. N° 4	peso	testigo		Amanece muerto

Con el fin de eliminar más aún esta posible objeción, la de la acción de pequeños residuos de anticuerpos plasmáticos, he estudiado la acción conjunta de pequeñas cantidades de suero antití-

fico incapaz de por sí solo de salvar un animal infestado, unida a la dosis eficaz de extracto leucocitario. Este ensayo nos demuestra que la adición del suero, no mejora en nada la acción del producto leucocitario.

Tanto las inyecciones como las infecciones se efectúan en el peritoneo.

El suero empleado ha sido obtenido de una cabra inmunizada, la dosis preventiva es de 0.000.25 c. c. El extracto es obtenido como siempre.

La extracción de líquido peritoneal efectuada a las 3 horas de iniciada la infección da el siguiente resultado: en el N.º 1 gran cantidad de leucocitos polinucleares, aislados, uno que otro bacilo, hay que recorrer varios campos para encontrar alguno, fagocitosis poco visible.

En el exudado del N.º 2 se encuentran gran cantidad de bacilos, algunos leucocitos, fagocitosis nula.

El cuadro del N.º 3 es semejante al del N.º 1 pero con menos elementos tanto de bacilos como de leucocitos. En el exudado del N.º 4 se observan gran cantidad de bacilos, pocos leucocitos, fagocitosis muy poco marcada.

Por la tarde las diferencias son más marcadas, en el N.º 1 se encuentra un cuadro semejante al observado por la mañana, pero con menos bacilos. En el exudado del N.º 2 se ve una enorme cantidad de bacilos, pocos leucocitos, algunos de ellos en leucolisis, con fagocitosis acentuada en los pocos polinucleares intactos. El líquido extraído al N.º 3 es puriforme, en él se encuentran gran cantidad de leucocitos, no se ven bacilos, ni aún recorriendo toda la preparación. En el exudado del N.º 4 se ve una enorme cantidad de bacilos, muy pocos leucocitos, con fagocitosis bastante acentuada.

Esta experiencia nos demuestra que la presencia de una pequeña cantidad de suero específico, no mejora la acción del producto leucocitario, más bien, a juzgar por lo observado en este ca-

so, la dificulta ligeramente, pues en el exudado del N°. 1 se encuentran bacilos durante mayor lapso de tiempo que en el N°. 3.

Para demostrar más aún, que la acción eficaz del extracto leucocitario se debe exclusivamente a él y no a una acción accesoria de elementos sobrè-agregados, he estudiado la acción conjunta de pequeñas cantidades de suero, con aquella de plasma que empleada en un ensayo anterior, demostró su ineficacia. También la unión de los dos elementos ha sido incapaz de salvar a los animalitos infectados.

CUADRO N° 15

Ch. N° 1	500	0.00.1 de suero antitífico y 0.000.05 de plasma de exudado inmune, peritoneal	Inmediatamente después son inoculados todos con 1/4 c. c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 2	mos	0.000.1 de suero antitífico, peritoneal		Amanece muerto
Ch. N° 3	de peso	0.000.05 de plasma de exudado inmune peritoneal		Amanece muerto

El suero empleado es el mismo que sirvió para la experiencia anterior..

Por el resultado obtenido se ve que la suma de las dos acciones no impide la muerte de los animalitos en experimentación. Como cada una de las cantidades empleadas es muy superior a la que pudiesen llevar como residuo los extractos leucocitarios, mal pueden ser esos posibles residuos los causantes de la acción altamente eficaz que ellos desarrollan en el combate contra las infecciones.

En las experiencias efectuadas con el producto leucocitario inmune, empleado como elemento curativo, se utilizan dosis de medio centímetro cúbico y podría creerse que en esta cantidad se en-

contrasen bastantes anticuerpos humorales, como para explicar, por sí solos, el proceso de sanación.

Para dilucidar este punto he tomado una cantidad similar de extracto de leucocitos comunes a la cual le he agregado diez veces la dosis de plasma empleada en la experiencia N.º 13, porque en este caso empleamos también diez veces más cantidad de producto leucocitario inmune. He sometido la mezcla de 0.5 c. c. de extracto de leucocitos comunes y 0.000.5 de plasma de exudado inmune a la acción de la calefacción mantenida durante media hora a la temperatura de 75° en presencia de una pequeña cantidad de gelatina, sometiendo a igual tratamiento, una cantidad similar de productos leucocitarios inmunes, pero como es lógico suponer sin adición de plasma.

El resultado obtenido como puede verse en el cuadro siguiente, demuestra que la sanación de los animalitos se debe exclusivamente a la substancia termo estable presente en el extracto de los leucocitos provenientes de animales inmunizados.

CUADRO N° 16

Ch. N° 1	500 gra- mos de peso	A las 9 a. m. se les inocula con 1/4 c. c. decultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	A las 10 a. m. 0.5 de extracto de leucocitos comunes y 0.000.5 de plasma inmune, en el peritoneo	Amanece muerto	
Ch. N° 2			A las 10 a. m. 0.5 de extracto de leucocitos inmunes, en el peritoneo	Se salva	
Ch. N° 3				A las 10 a. m. 0.5 de extracto de leucocitos comunes, en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 4				testigo	Amanece muerto

Todos los extractos y sus mezclas son sometidas durante 40 minutos a la calefacción en la estufa seca a la temperatura de 75° habiéndoseles agregado con anterioridad 0.1 c. c. de gelatina común de cultivo previamente, fluidificada y un centímetro cúbico de solución fisiológica, por cada medio centímetro cúbico del producto a fin de evitar su coagulación.

A las 5 de la tarde, es decir siete horas después de efectuada la inyección de los productos leucocitarios, los números 1, 2 y 4 están gravemente enfermos, acurrucados en un rincón de la jaula, con el pelo erizado, el vientre tenso y doloroso, en cambio el N.º 2 que en las primeras horas de la tarde se mostró algo enfermo se encuentra ahora aparentemente sano, en su líquido peritoneal no se observan bacilos, en cambio se encuentran gran cantidad de leucocitos, sucediendo todo lo contrario en el exudado de los otros tres en los cuales se observa una enorme cantidad de microorganismo con muy pocos leucocitos, y fagocitosis casi nula.

La experiencia es peñentoria, la causa de la sanación del N.º 2 no puede ser otra que la substancia que le han cedido al extracto los leucocitos provenientes de animales inmunizados.

Una duda puede aparecer en el espíritu de los reacios; podría decirse que este producto se encuentra casualmente en los conejillos de India y no en otras especies de animales. Esta objeción se destruye fácilmente ensayando leucocitos de otras especies, en sujetos que hayan sido previamente vacunados.

Al efecto, he experimentado con extractos de leucocitos de conejos inmunizados en contra del bacilo de Eberth también, siguiendo para su obtención una técnica idéntica a la empleada en la investigación efectuada en los cobayos. El resultado conseguido como puede apreciarse en el cuadro siguiente, es tan halagador como los anteriores.

Los leucocitos son obtenidos de exudados pleurales provocados por la inyección de caseína al 8 o|o recientemente preparada en conejos, los unos inmunes y los otros vírgenes de vacunación. Se

inyectan alrededor de 20 c. c. en dos porciones una a la mañana y otra por la tarde de la víspera de la extracción leucocitaria. Exudado que sufre igual tratamiento que aquel a que han sido sometidos los de los conejillos de la India.

CUADRO N° 17

Ch. N° 1	300 gra- mos de peso	A las 9 a. m. se les inocula con 1/4 c.c. de cultivo en caldo de 24 horas de edad del bacilo de Eberth en el peritoneo	A las 10 a. m. se le inyecta con 0.8 de extracto de leucocitos virgenes en el peritoneo	Amanece muerto
Ch. N° 2			A las 10 a. m. se le inyecta con 0.8 de extracto de leucocitos inmunes en el peritoneo	Se salva
Ch. N° 3				testigo

Tanto el extracto inmune como el común han sido sometidos a la calefacción durante 40 minutos en la estufa seca a la temperatura de 75°, previa adición de 0.2 c. c. de gelatina de cultivo, fluidificada, por centímetro cúbico de producto al cual se le agregaba igual cantidad de solución fisiológica para impedir su coagulación.

El cobayo N.° 2 se nota enfermo antes que los otros, con el vientre muy tenso y doloroso; pero a las cuatro de la tarde principia a mejorar rápidamente, tanto que hora y media después se encuentra sano, mientras que los otros dos a esa hora se encuentran gravemente enfermos, en peores condiciones de las que estuvo anteriormente el N.° 2.

El resultado de esta prueba confirma enteramente el obtenido en anteriores, demostrándonos que la presencia de sustancias es-

peciales en los leucocitos de los animales inmunizados no es un hecho exclusivo de los conejillos de India, sino muy probablemente un hecho general.

En el caso especial de esta última experiencia, lo único que se nota es que se necesita mayor cantidad de extracto leucocitario de conejo que de su similar de cobayo.

Como conclusión debemos afirmar que con esta serie de experiencias queda demostrada, por primera vez, la presencia indiscutible de substancias especiales en los leucocitos de los animales inmunizados en la inmunidad anti-infecciosa, substancias mediante las cuales estas células son más aptas que sus similares comunes para la lucha en contra de las infecciones. Ellas se encuentran en pequeña cantidad, lo que se explica fácilmente, porque tratándose de un elemento que se encuentra en células vivas, estas reproducirán con facilidad la substancia especial a medida que ella se agote.

En conjunto nos demuestra una constitución semejante a la de las substancias bactericidas del suero, una porción termoinstable; las endolisinas y otra estable: el anticuerpo leucocitario.

Esta substancia, a juzgar por lo que se observa en el carbunco, no pasa con facilidad al medio ambiente, sino previa destrucción de las células.

Esta substancia especial, que por ahora y para no prejuizar nada, la llamaremos anticuerpo leucocitario, cuando es inyectada en una dosis alta, por sí solo destruye los microbios, no hay leucocitosis sino tardía, respondiendo ella más bien a la acción del mismo líquido inyectado y a la de los productos bacilares que nacen a consecuencia de la digestión de los microbios. Tan es así que, en las primeras horas de la infección, solo se encuentran en el líquido peritoneal linfocitos y la reacción polinuclear es tanto más precoz cuanto menor es la dosis leucocitaria inyectada.

La presencia de este cuerpo especial en los leucocitos de los animales inmunizados explica fácilmente la causa de la persisten-

cia del estado de inmunización sin la existencia de los anticuerpos humorales.

Este último hecho perfectamente constatado por muchos autores, entre los cuales podemos citar a Svenson (25), el mismo Kollé (26), a Sobernheim (27), etc., y demostrado experimentalmente por Libermann y Acel (28) no encontraba hasta ahora su explicación; la presencia del anticuerpo leucocitario hace luz en este hecho aparentemente inexplicable y da razón a la tesis que he sostenido tanto tiempo de las leucocitosis específicas. (29).

En las leucocitosis comunes se acumula una enorme cantidad de leucocitos y solamente un pequeño número de células son las que fagocitan; hecho que es fácil observar por poco que se trabaje en este punto, mientras que en el animal inmunizado aunque no se encuentran anti-cuerpos en la sangre, el número de leucocitos que acuden al lugar de infección es mucho menor pero ellos son más eficaces.

En una palabra, la inflamación provocada es menor, es menos intensa pero más saludable, más útil. Como también lo he podido demostrar en la inyección de leucocitos vivos de animales inmunizados, de los cuales hay que emplear mucha menor cantidad que de sus similares comunes, porque son más aptos para dominar la infección y son específicos. Se obtiene en este caso una leucocitosis específica pasiva, con resultados idénticos a la leucocitosis específica activa, que se produce en los animales activamente inmunizados.

El factor mediante el cual se pueden producir estas leucocitosis específicas es justamente el cuerpo que he tenido la suerte de poner en evidencia.

No son absolutamente necesarios en la inmunidad anti-infecciosa los anticuerpos humorales para que el estado de inmunidad exista; ellos son accesorios, fugaces, no así las modificaciones celulares, que colocan en estado de alergia al organismo y entre los cuales debemos contar a las propiedades adquiridas por los leuco-

bitos y como es lógico suponer a la de sus elementos madres, a su fuente de origen, a los tejidos hematopoiéticos.

Podemos considerar a los anticuerpos humorales como una vanguardia que por sí sola, en casos favorables, puede detener una invasión microbiana; pero la lucha eficaz, segura, definitiva, está siempre a cargo de los leucocitos y solamente de estos últimos, cuando los primeros, que no son imprescindibles, faltan por una u otra razón. La que no debe faltar, para impedir la invasión microbiana, es la barrera leucocitaria, la que se transforma en leucocitosis o fagocitosis específica, cuando los polinucleares que acuden están cargados del anticuerpo leucocitario. En este caso pocos de ellos bastan, no hay en el sitio de invasión sino una ligera inflamación, la que es suficiente para llenar su objeto, gracias a la cantidad de los glóbulos blancos que han acudido para dominar la infección; ellos cualitativamente modificados, pueden efectuar una activa fagocitosis específica, gracias a la presencia del anticuerpo leucocitario, el que no es sino una manifestación material de la modificación funcional de los leucocitos, modificación altamente benéfica para el organismo en su lucha en contra de los microbios.

#### ALOIS BACHMANN

Director del Instituto de Bacteriología  
y Profesor de Bacteriología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba.

---

#### BIBLIOGRAFIA

- DENYS et LECLEF—*Sur le mécanisme de l'immunité chez le lapin vaccine contre le streptocoque*. La cellule T. II. pág. 177.
- WRIGHT—*Studien über Immunisierung*. Jena 1900.
- NEUFELD F.—*Bacteriotropine und opsonine*. Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen. Kolle u. Wassermann 2. Auflage 2. B. I. Hälfte pág. 401.
- CANTACUZENE J.—*Destruction des vibrions dans l'organisme*. Anna. de l'Inst. Pasteur. 1898. pág. 273.

- OPPEL—*Influence de la teinture d'opium sur l'immunité*, cite dans Baumgarten's Jahresberich t. 1901, pág. 875.
- GEORGEWITSCH C.—*Immunité viv a vis de bacille pyomyanique*. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1899, pág. 298.
- SHOUKEWICHT J.—*Recherches sur l'immunité des lapins*. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1910, pág. 728.
- DELANOE—*La Phagocytose dans l'immunité*. Ann. de l'Inst. Pasteur 1912 pág. 172.
- WEIL—*Wirkung der Leukocyten bei intraperitonealer Cholerainfektion*. Centralbl. f. Bak. T. 43, pág. 190.
- BACHMANN A.—*Las teorías de la inmunidad*. Buenos Aires. 1905.
- BACHMANN A.—*Contribución al estudio de la inmunidad*. Anales del Círculo Médico Argentino. Marzo de 1902.
- WERNICKE—*Cité dans L'Immunité*, E. Metchnikoff. pág. 20.
- NITTIS—*Immunité des pigeons et des cobayes*. Ann. de l' Inst. Pasteur. 1901, pág. 769.
- METCHNIKOFF E.—*L'Immunité*. Paris 1901.
- BACHMANN A.—*Las células y el plasma en la inmunidad carbunclosa*. Anales del Círculo Médico Argentino. Diciembre de 1902.
- PETTERSSON A.—*Die Rolle der Leukocyten im Kampfe gegen die Infektion*. Centralbl. f. Bak. 1906. T. 42, pág. 56. et T. 45, pág. 160.
- SALIMBENI A.—*Les modifications des globules blanc dans l'immunité acquise*. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1909, pág. 558.
- SCHNEIDER R.—*Die bakterizide u. hamolitische Wirkung etc.* cité dans Folia Serologica. T. 3. Pág. 371.
- PETTERSON A.—*Studien über Endolysinen*. Centralbl. f. Bak. 1908. T. 46 pág. 405.
- BUCHNER H.—*Ueber Immunitat u. Immunisierung*. Centralbl. f. Bak. T. 16. pág. 737.
- SCHATTENFROH A.—*Ueber hitzebeständige bactericide Leukocytenstoffe*. Münchener med. Wechr. 1898, pág. 1109.
- PETTERSSON A.—*Ueber hitzebeständige, alkollösliche, bakterizide Substanzen der Leukocyten*. Zeitschr. f. Immunitat f. u. exper. Therapie. T. I. pág. 52.
- KLING C.—*Untersuchungen über die bakterientotenden Eigenschaften der weissen Bluthörperchen*. Zetschr. f. Immunitatsf u. esper. Therapie T. 7. pág. 1.
- PETTERSSON A.—*Studien über Endolysinen*. Centralbl. f. Bak. T. 60 pág. 286.

- SVENSON—*Aglutinine u. Bakteriolytine im Blut von Cholera-kranken* Zeitschr. f. Hyg. T. 64. pág. 342.
- KOLLE—*Die Grundlagen der Lehre von der erworbenen Immunität Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen.* h. v. Kolle u. Wassermann. 2. Auflage. T. I. pág. 909.
- SOBERNHEIM—*Die Lehre von der Immunität.* Handbuch der allgemeinen Pathologie, herausg. v. Krehl u. Marchand. T. I. pág. 447.
- LIEBERMANN u. ACEL—*Cité dans le Bulletin de L'Inst. Pasteur.* 1917, p. 555.
- BACHMANN A.—*Immunidad anti-infecciosa.* Revista del Círculo Médico de Córdoba 1915.
-