

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Bioquímica. — Madrid

## Producción experimental de proteidasas específicas

### *II. Experiencias con toxina de "Corynebacterium diphtheriæ"*

por J. LUCAS GALLEGO, M. ESCRIBANO ARNAL y A. SANTOS RUIZ

(Recibido para publicar el día 21 de Junio de 1947)

En un trabajo anterior (1) nos referíamos a las experiencias realizadas con «corynebacterium diphtheriæ» muerto, y en ellas se demostraba que la provocación experimental de enzimas específicas eliminadas por la orina del conejo daba resultado positivo en la totalidad de las pruebas con la reacción de la ninhidrina. Por lo tanto, el corynebacterium diphtheriæ muerto, desprovisto de toxina, posee proteidos que dan lugar, al ser inyectados en el conejo, a la producción de fermentos defensivos específicos capaces de desintegrarlos.

Se plantea ahora el problema de saber si la toxina producida por el bacilo, debido a su carácter proteídico, es capaz también de producir, en los animales de experiencia, proteidasas específicas, demostrables en la orina por la reacción de ABDERHALDEN denominada de los fermentos defensivos.

La toxina se produce debido al metabolismo del bacilo en los cultivos, que pasa al medio e inoculada a los animales de experimentación da el cuadro diftérico. BREIGER y FRAENKEL (2), llegaron a establecer su constitución proteínica y la consideran como una toxialbúmina que puede ser digerida por la pepsina y la tripsina. A pesar de ello GUINOCHET (3), dice haberla obtenido en cultivos exentos de toda clase de substan-

cias proteicas, y USCHINSKY (4), (5), confirma estos hechos. SZIERGOWKY y RENOWSKY (6), señalan la importancia de la reacción del medio para su formación. Según KOSEL (7), la toxina es un producto de excreción del bacilo que elimina a medida que se forma. HIDA (8) e HIDA y TURUCHI (9), dicen que la toxina es un producto de la degradación enzimática de las proteínas del cultivo. TAMURA (10), en su estudio sobre la composición química del bacilo demostró que además de un monofosfátido y un lipóide se observan diversos amino-ácidos (arginina, prolina, histidina, tirosina, leucina, isoleucina, valina y tiptófano), formando parte de su molécula proteica. Por estos trabajos se ve que existen dos tendencias para explicar la formación de la toxina: Una sostenida por HADLEY y USCHINSKY, que suponen es sintetizada por el bacilo y otra mantenida por HIDA y sus colaboradores, que sostienen que es el resultado de la degradación enzimática de las bacterias. Finalmente PAPPENHEIMER (11), MULLER (12), EATON (13), (14), (15), han demostrado de una manera indudable que la toxina se origina por un proceso de síntesis del bacilo diftérico. PAPPENHEIMER, en su trabajo, da un cuadro con la composición química y actividad biológica de la toxina diftérica purificada.

El poder antigénico está relacionado con la estructura proteica de la toxina y de aquí la íntima relación que existe entre el poder antigénico, y la concentración de las toxinas específicas de los caldos. Está en razón inversa con el poder tóxico y la toxina diftérica los posee en grado considerable.

Las toxinas producidas por los tres tipos de bacilo (gravis, intermedio y mitis) son idénticas, pero en cambio parece seguro que el gravis posee una capacidad mayor de multiplicarse en el organismo.

Al lado de la toxina diftérica, producto soluble, existe en el cuerpo microbiano una sustancia adherente al bacilo, la endotoxina y hay autores que emiten la opinión de que esta sería la causante de la parálisis diftérica en el hombre. Se ha demostrado que la inyección subcutánea de una pequeña suspensión de bacilo muerto por el calor a la temperatura de 100 grados (con lo que habría sido destruido de una manera absoluta y total la exotoxina) producía una intoxicación en el cobaya, de lo que se deduce que en los cuerpos bacilares hay una sustancia tóxica responsable. Esta intoxicación es anulada

con la antitoxina correspondiente, lo que explicaría que los sueros mixtos antitóxicos-antimicrobianos, evitan mejor los fenómenos paralíticos que los antitóxicos solo.

RAMÓN (16) dió el nombre de anatoxina diftérica al producto de la transformación de la toxina que se logra al agregarle una pequeña cantidad de formol y teniéndola a la temperatura de 37° durante tres meses. Posee el poder floculante de la toxina y una perfecta inocuidad para el animal de experimentación, en el cual no se produce antitoxina específica. Esta inocuidad de la anatoxina es absoluta desde el punto de vista tóxico, aunque puede producir reacciones locales o generales más o menos intensas. La inmunidad producida llega a su máximo en las semanas que siguen a su administración. Cuando la inmunidad obtenida es escasa, se refuerza por la administración de una nueva dosis de anatoxina.

## PARTE EXPERIMENTAL

En nuestra comunicación anterior ya señalamos la preparación del substrato de toxina, que en estas experiencias utilizamos para la comprobación de los fermentos específicos correspondientes.

El método para la preparación de la orina, obtención de substratos y en general de la técnica de la reacción ha sido la ya descrita. Por ello omitimos aquí detalles ya conocidos y solamente nos referiremos a aquellos que afectan a estas experiencias.

### a) *Determinación de dosis de toxina.*

Se parte de una dilución de toxina al 1/1.200 de la cual 1 c. c. m. d. m. e inyectamos un lote de siete conejos con dosis progresivas de la dilución de toxina, o sea, 0,05 c. c. al primer conejo y a cada uno de los siguientes, se aumenta la dosis en 0,025 c. c., con lo que resulta que el conejo siete es inyectado con 0,2 c. c. Del cuadro 1, se deduce que el conejo 1 continúa con una eliminación normal de orina y que son negativas las pruebas con todos los substratos (substrato de placenta P, substrato de bacilo B, de toxina T y en los controles); los seis conejos restantes, durante los días primero y segun-

do, tienen oliguria, que impide realizar la reacción y al tercer día la orina elimina ésta en cantidad suficiente para verificar la reacción. Su sedimento acetónico da resultado negativo con los substratos y los controles en los conejos 1, 2, 3 y 4, y positivo en los 5, 6 y 7, con el substrato de toxina y permanecer negativo en las pruebas con los otros substratos y controles.

Por lo cual, la dosis mínima de dilución de toxina que inyectada al conejo da lugar a la eliminación de proteidasas defensivas, demostrables por el método, es de 0,15 c. c.

#### b) *Determinación de la dosis mínima de anatoxina*

De la misma manera que en los casos anteriores, procedemos a determinar la cantidad mínima de anatoxina que es capaz de producir eliminación de enzimas defensivas, para lo cual tomamos un lote de siete conejos y después de comprobar la negativa de la reacción, procedemos a inyectarlos con anatoxina comercial «Ibys» en una dilución al 1/1.200, con dosis progresivas crecientes a partir de 0,05 c. c. hasta 0,2 c. c., con lo cual tenemos que cada dosis es igual a la anterior más 0,025 c. c. El cuadro número 2, nos demuestra que la dosis mínima a inyectar, capaz de producir eliminación urinaria de proteidasas defensivas específicas, es de 0,15 c. c.

No creemos necesario trabajar con substrato de anatoxina, ya que este producto tiene las mismas proteínas que la toxina, puesto que su composición es toxina más formaldehído.

#### c) *Experiencias con inyección de toxina*

En estas experiencias hemos seguido una marcha similar a la empleada en el grupo anterior, que consiste en inyectar un lote de conejos con 0,15 c. c. de dosis de toxina, con arreglo del resultado que se deduce del cuadro 1, sobre la determinación de dosis de toxina. En otro lote, después de la inyección de toxina, se ha realizado el tratamiento con anatoxina y la tercera parte de la experiencia se ha hecho con un lote de conejos, previamente vacunados.

a) *Inyección de toxina, sin tratamiento*

Trabajamos con un lote de 50 conejos y después de comprobar que no eliminan fermentos defensivos que desintegren los substratos de bacilo, toxina y placenta, procedemos a inyectarlos con 0,15 c. c. de la dilución de toxina al 1/1.200. En las primeras 48 horas que siguen a esta administración, se produce una oliguria intensa, que impide el realizar las determinaciones, por ser insuficiente la cantidad de orina para ello. Al tercer día la eliminación es normal y realizamos la primera determinación, en la cual apreciamos la existencia de proteidasas defensivas, demostrables por la reacción de la ninhidrina y vemos en el cuadro número 3 que estas proteidasas son específicas para el substrato de toxina, al cual desintegran, pero no producen la hidrólisis de los substratos de placenta y bacilo, excepto en determinaciones aisladas, por lo cual pierde valor esta positividad. En los demás casos se mantiene negatividad, así como en los controles; los conejos 9, 16, 27, 36 y 40, dan reacción al substrato de placenta y los 1, 7, 12, 16, 32, 34, 42 y 48, al de bacilo, pero que por ser aislado no tiene significación. Si analizamos la gravedad de la intoxicación en relación con la intensidad de la reacción, observamos que los conejos 5, 9, 10, 15, 20, 22, 24, 31, 32, 35, 36, 38, 40, 48 y 49, que padecen la intoxicación con más gravedad, son los que presentan menor intensidad en la reacción y que la eliminación de los fermentos defensivos alcanzan su punto óptimo al estabilizarse el proceso, en tanto que en aquellos que padecen la intoxicación más leve, conejos 7, 12, 14, 18, 23, 26, 28, 30, 34, 44 y 45, presentan una acusada reacción desde las primeras determinaciones y que en todos los restantes que padecen una toxicidad media; la reacción alcanza su mayor intensidad en las segunda y tercera determinaciones. En los casos de proceso leve, cesa en algunos en la séptima determinación, conejos 22, 34, 35 y 38, mientras que en los que padecen intoxicación más grave, todavía puede apreciarse en la octava determinación y cesa en la novena, como ocurre en los conejos 7, 18, 23, 26, 34, 44 y 45.

*β) Inyección de toxina y tratamiento con anatoxina*

En un lote de 27 conejos se ha hecho la inyección en igual forma que en el caso anterior y a las 18 horas se han tratado con 0,25 c. c. de anatoxina. Durante las 48 primeras horas a partir de la inyección de toxina la eliminación urinaria es tan escasa que no permite realizar la reacción. Al tercer día la orina es suficiente y practicamos la primera determinación, que nos demuestra la presencia de proteidasas defensivas que hidrolizan el substrato de toxina en todos los casos (cuadro número 4). Por lo que se refiere a la gravedad del proceso y su relación con la intensidad de la reacción, observamos que en aquellos conejos en que la gravedad del proceso es más fuerte, conejos 4, 8, 12, 13, 17, 18 y 20, la reacción es menos intensa, mientras que en los conejos 9, 14, 24, 25 y 27 que el proceso es más débil, ésta es más intensa y la eliminación urinaria de fermentos defensivos cesa en los conejos 24 y 25, en la séptima determinación, así como en los más graves, termina en algunos de ellos en la novena determinación, conejos 4, 8, 12 y 17. Como en casos anteriores se observa que algunos conejos dan una sola reacción positiva a los substratos de placenta o bacilo, los conejos 8, 9, 10, 14 y 17, al primero y los conejos 2, 6, 12 y 18 al segundo, que por ser un caso aislado carece de todo valor porcentual, para las consideraciones.

*γ) Inyección de toxina en conejos vacunados*

En un lote de 27 conejos vacunados y cuando están en período de inmunidad, administramos subcutáneamente 0,15 c. c. de la dilución del substrato de toxina. En las primeras 48 horas existe oliguria intensa que nos impide practicar la reacción y se comienzan las pruebas a partir del tercer día en que tenemos la orina en cantidad suficiente. Del cuadro número 5 se deduce la eliminación de fermentos defensivos que hidrolizan al substrato de toxina en todos los casos y solamente los conejos 9, 15 y 22, eliminan fermentos que desintegran al substrato de bacilo y los conejos 4, 6, 8, 11 y 18, al substrato de placenta, pero solamente en una sola determinación. La gravedad del proceso es muy pequeña y la intensidad de la

reacción es intensa desde un principio y cesa en la séptima determinación en los conejos 2, 3, 7, 19, 20 y 25, y solamente los conejos 18 y 23 cesan en la octava determinación coincidiendo el 18, con una intensidad mayor del proceso.

d) *Experiencias con administración subcutánea de anatoxina*

Las hemos realizado en dos lotes de conejos uno de 27 y otro de 18. Los conejos del primer lote se han inyectado con 0,15 c. c. de anatoxina comercial «Ibys» y del cuadro número 6, deducimos que se han producido proteidasas defensivas que desintegran el substrato de toxina en todos los casos; en algunas determinaciones aisladas, en los conejos 6, 7, 16, 23 y 27, se produce la digestión del substrato de bacilo y en los conejos 5, 19, 21 y 26, la del substrato de placenta.

El segundo lote de 18 conejos lo hemos inyectado con dosis mayores (1 c. c. de anatoxina) y del cuadro número 7 deducimos que la eliminación de fermentos se prolonga hasta la doce determinación, lo que nos demuestra que el aumento de la dosis inyectada de anatoxina, influye en el tiempo de eliminación urinaria de fermentos defensivos que desintegran al substrato de toxina.

\* \* \*

En resumen: las pruebas realizadas con toxina o anatoxina, aisladamente o en conjunto, demuestran también la aparición de fermentos defensivos específicos desintegradores de los proteídos constitutivos de estas sustancias; en particular, los inoculados con anatoxina aclaran que la presencia del formaldehído, no impide la aparición de dichos enzimas.

CUADRO 1

Conejos	N.º c. c. iny.	Subs.	D Í A S			
			1	2	3	4
1	0,050	K	—	—	—	—
		P	—	—	—	—
		B	—	—	—	—
		KT	—	—	—	—
		T	—	—	—	—
2	0,075	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—
3	0,100	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—
4	0,125	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—
5	0,150	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	++	++
6	0,175	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	+	++
7	0,200	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	+	+

*Nota:* Cuando no hay orinas o están en cantidades insuficientes para hacer la reacción los representamos por .

CUADRO 2

Conejos	N.º c. c. iny.	Subs.	D Í A S			
			1	2	3	4
1	0,050	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—
2	0,075	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—
3	0,100	K	.	.	—	—
		P	.	.	—	—
		B	.	.	—	—
		KT	.	.	—	—
		T	.	.	—	—

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

4	0.125	K	.	.	---	---
		P	.	.	---	---
		B	.	.	---	---
		KT	.	.	---	---
5	0.150	K	.	.	---	---
		P	.	.	---	---
		B	.	.	---	---
		KT	.	.	---	---
6	0.175	T	.	.	+	++
		K	.	.	---	---
		P	.	.	---	---
		B	.	.	---	---
7	0.200	KT	.	.	---	---
		T	.	.	++	++
		K	.	.	---	---
		P	.	.	---	---

Nota: Cuando no hay orinas o están en cantidad insuficiente para hacer la reacción, lo representamos por -.

CUADRO 3

Comjos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	T	++	+++	++++	++++	+++	++	+	---	---
	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	---	---
	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	++	++	+++	+++	+++	++	+	---	---
	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	++	+++	++	++	+++	++	++	---	---
6	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7	T	++	+++	+++	+++	+++	++	++	---	---
	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	B	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7	KT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---

8	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++	++	++	++	+	—
9	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	+	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	++	+	+	+	—
10	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	+	++	+++	+++	++	—
11	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++	+++	+++	+++	++	+	—
12	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	+	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
13	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
14	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	—
15	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	+++	++	—
16	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	+	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	+++	+++	++	—
17	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	+++	+	—
18	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—
19	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
20	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—



34	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
35	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	++	++	+++	+++	++	+
36	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	+	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	++	—
37	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
38	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	+	+	++	+++	+++	++
39	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	++	++	++	+	—
40	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	+	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
41	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
42	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	+	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
43	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	—
44	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
45	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—
46	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

47	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—
48	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
49	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
50	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—

CUADRO 4

Conejos	Sub	DETERMINACIONES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
2	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	KT	+++	+++	+++	++	++	++	+	—	—
3	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	—	—
4	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+	+	+++	++	+++	+++	+++	+	—
5	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
6	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	++	+++	++	+	—	—
7	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—

8	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	+	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+
9	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	+	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+++	+++	+++	++	++	+	+	-
10	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	+	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	++	++	+++	+++	+++	++	++	-
11	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	++	+++	+++	+++	++	++	+	+
12	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	+	-	-	-	-
	T	+	+	+	++	++	++	+	+
13	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+	+	++	+++	+++	++	++	-
14	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	+	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
15	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	++	+++	+++	+++	++	++	+	-
16	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	++	++	+++	+++	++	++	++	-
17	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	+	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+	+	+	++	++	++	+++	++
18	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	+	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+	+	++	+++	+++	++	+	-
19	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	++	++	+++	+++	+++	+	+	-
20	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+	+	++	++	++	++	+	-

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

271

21	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
22	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
23	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
24	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	++++	++	+	—	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—
25	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	+++	+	—	—
26	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
27	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	++++	++	++	+	—

CUADRO 5

Conejos	Subs.	DETERMINACIONES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	—	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	—	—

5	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	R	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
6	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	+	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	++++	+++	++	+	—
7	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
8	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	+	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	—
9	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	+	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	—
10	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
11	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	+	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	—
12	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	+++	++	++	++	—
13	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	—
14	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	—
15	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	+	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	++++	+++	++	+	—
16	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
17	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

18	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	+	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	++	++	++	—
19	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
20	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—
21	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
22	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	+	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	++	++	+	—
23	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+
24	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	+	+	+	—
25	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
26	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
27	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	—

CUADRO 6

Conejos	Subs.	DETERMINACIONES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	++	+	+	—	—

2	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	+++	+++	++	+	—
3	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	++	—
4	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	++++	++++	++	+	—
5	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	+	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	++	++	+++	+++	++	+
6	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	+	—	—
	T	+++	++	+++	+++	+++	++	+	—
7	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++++	++++	++	+	—	—
8	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	+	—
9	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	++	++	+++	+++	+	+
10	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
11	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	++	++	+	—
12	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
13	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	+++	+++	++	++	++	—
14	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	++	++	+	—

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

15	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	+++	+++	++	—	—
16	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	+	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+	+	+	—
17	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	+	++	++	+	—
18	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
19	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	+	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++++	+++	++	+	—
20	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	+++	+++	+	+	—
21	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	+	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++	++	++	+	—
22	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++	+++	++	++	++	—
23	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	+	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	++++	++++	+++	+++	++	++	—
24	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	++	+++	+++	++	+	—
25	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	++	+
26	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	+	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
27	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	+++	+++	++	+







## CONCLUSIONES

1.<sup>a</sup> La inyección de toxina a conejos produce la aparición en la orina de estos animales de fermentos específicos que desintegran el substrato de toxina y esta eliminación es tanto menor cuanto mayor es la dosis de toxina y viceversa, lo cual parece indicar que la capacidad de defensa del organismo está disminuída en los estados de intoxicación grave.

2.<sup>a</sup> En los conejos inyectados con toxina y tratados posteriormente con anatoxina, los experimentos nos demuestran la presencia de proteidasas defensivas que hidrolizan el substrato de toxina, y como en el caso anterior también la intensidad de la reacción es inversamente proporcional a la gravedad del proceso tóxico.

3.<sup>a</sup> La vacunación de los animales no impide tampoco la eliminación de las enzimas defensivas específicas cuando se les administra dosis suficiente de toxina.

4.<sup>a</sup> La administración subcutánea de anatoxina origina la formación intraorgánica y subsiguiente aparición en orina de fermentos defensivos específicos frente al substrato de toxina. El aumento de las dosis de anatoxina influye proporcionalmente en el tiempo de eliminación urinaria de dichas enzimas específicas.

## Summary

The injection of toxin to rabbits causes the appearance in the urine of these animals of specific ferments which desintegrate the toxin substratum, and the greater is the toxin dosis, the smaller this elimination, and viceversa, which seems to indicate that the defensive capacity of the organism is diminished in the states of serious poisoning.

In the rabbits injected with toxin and treated later with anatoxine tests demonstrate the presence of defensive proteasen, which hydrolize the toxin substratum. As in the former case, the intensity of the reaction stands in inverse ratio to the gravity of the toxic process.

The vaccination of the animals does not prevent either the elimination of the specific defensive enzymes, when a sufficient dosis of toxin is administered.

The subcutaneous application of anatoxin causes the intraorganic formation, and consequent appearance in the urine, of specific defensive ferments in presence of the toxin substratum. The increase

of the anatoxin dosis influences proportionally the time of elimination through urine of said specific enzymes.

### Bibliografía

1. Esta Revista, 3, 109, 1947.
2. BREIGER y FRAENKEL: Ref. Berl. Klin. Woches., 27, 241, año 1890.
3. GUINOCHET: Ref. C. R. Soc. Biol., 4, 480, 1892.
4. USCHINSKY: Ref. Zent. f. Bakt., 14, 316, 1897.
5. USCHINSKY: Ref. Zent. f. Bakt., 21, 146, 1897.
6. SZIERGOWSKY y RENOWSKY: Ref. Archs. Scien. Biol., 1, 167, año 1892.
7. KOSEL: Ref. Zent. f. Bakt., 19, 979, 1896.
8. HIDA: Ref. Zeits. f. Hyg. u. infek, 41, 273, 1908.
9. HIDA y TERUCHIH Ref. Zeits. f. Biochem., 14, 794, 1913.
10. TAMURA: Ref. Zeits. f. Physiol. Chem., 89, 289, 1914.
11. PAPPENHEIMER A.: Jour. Bact., 43, 273, 1942.
12. MUELLER J.: Bact. Revs., 4, 97, 1940.
13. EATON M.: J. Bact., 31, 347, 1936.
14. EATON M.: J. Bact., 31, 367, 1936.
15. EATON M.: J. Bact., 34, 139, 1937.
16. RAMÓN G.: C. R. Soc. Biol., 86, 711, 813, 1922; Ann. Inst. Pasteur, 38, 1, 1934 y Arch. Inst. Past. Alger, 4, 16, 1926.