

RÉSUMÉ

On fait une étude de la constitution antigénique des poussières de la maison et du grenier au point de vue immunologique par précipitation en gels sur deux dimensions, selon la technique de Oudin-Ouchterlony.

Dans les extraits crus on identifie les allergènes du milieu (plumes, crin végétal, bois parasites); le reste est formé par des produits humains.

Dans les extraits purifiés (Sutherland) les allergènes du milieu sont éliminés; ces extraits sont formés immunologiquement par des produits humains, selon l'ordre suivant de fréquence: produits dermiques humains, salive, sérum et urine. Certains de ces produits humains ont été identifiés comme une mucoprotéine.

La constitution antigénique de la poussière du grenier est moins complexe, car elle est formée par trois éléments: gluten, parasites du grenier (*Calandra Granaria*) et une substance commune aux poussières des maisons, aussi bien rurales que les urbaines, ce qui fait croire qu'il s'agit d'un allergène de milieu sur-ajouté.

ANTIGENOS POTENTES EN LAS SECRECIONES HUMANAS

C. JIMÉNEZ DÍAZ, J. M. ALÉS y J. M. SEGOVIA.

Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas.
Profesor: C. JIMÉNEZ DÍAZ.

En un trabajo anterior¹ comunicábamos un conjunto de observaciones sobre el diferente comportamiento de los sueros humanos, normales y alérgicos en la provocación del llamado "choque paraespecífico". En esencia, este fenómeno consistía en lo siguiente: Si a un cobaya, sensibilizado previamente a la ovalbúmina, se le inyectaba por vía intravenosa suero humano normal, se le desencadenaba un choque anafiláctico. El cuerno uterino, así como el íleon terminal, no quedaban descargados para la albúmina de huevo, pues con las técnicas apropiadas veíamos que se producía contracción de los mismos al añadir ovalbúmina al líquido de perfusión. Si en lugar de suero de un sujeto normal inyectábamos suero de un sujeto alérgico, no se producía el choque anafiláctico.

Este hecho nos llamó poderosamente la atención, ya que podía revelar diferencias entre el suero normal y el alérgico. En la mencionada comunicación previa hacíamos algunas consideraciones sobre posibles hipótesis que explicasen

el fenómeno, que naturalmente necesitaba ser confirmado y explorado con más detalle.

Proseguimos las experiencias en nuestro Instituto y comenzamos a observar que el fenómeno se hacia cada vez más inconstante, hasta que pasados unos meses más dejó de producirse. Ya que las condiciones experimentales eran las mismas, variando únicamente la época del año en que las hacíamos, pensamos en una posible influencia de factores climáticos desconocidos que fueran un eslabón importante en la aparición del fenómeno; algo similar a las variaciones ya conocidas de la tasa de complemento en el plasma del cobaya. Pero esto tampoco nos satisfizo al observar que en otra época similar (primavera) el fenómeno tampoco se reproducía. No dependía tampoco de la cuantía de anticuerpos antialbúmina de huevo en el suero del cobaya. Mediante la técnica de Proom (inyección intramuscular del antígeno sensibilizante adsorbido con alumbre) obteníamos títulos muy elevados de anticuerpos (hasta 145 gammas de N-anticuerpo dosificado por la técnica de Heidelberger) sin que apareciera el choque paraespecífico. Tam poco dependía de la vía empleada para la sensibilización. Revisando cuidadosamente las circunstancias que imperaban en la colonia de cobayas en la época de las primeras experiencias (mayo de 1954), nos dimos cuenta que los animales empleados en las mismas, aunque no habían recibido ninguna inyección previa de materiales humanos (orina, esputos, líquido cefalorraquídeo, etc.), eran sin embargo hijos de animales empleados en estas inoculaciones (teníamos escasez de cobayas en aquella época) y posiblemente habían sido sensibilizados por vía placentaria con los anticuerpos producidos en la madre.

Esta explicación exigía entonces demostrar la presencia de antígenos, extraordinariamente potentes en las secreciones humanas, capaces de provocar en el animal una sensibilización durable y transmisible a la descendencia. En este sentido realizamos nuevas investigaciones destinadas a conocer si en la orina normal existía este antígeno que, inyectado al cobaya, le sensibilizara anafilácticamente y de manera tan poderosa a los productos humanos. Elegimos la orina, en primer término, por ser el producto que con más frecuencia se emplea en el laboratorio para las inoculaciones a cobayas, y sobre todo porque se prestaba con más facilidad a un estudio fraccionado del antígeno o antígenos que pudiera contener. En todas las experiencias empleamos como antígeno desencadenante una mezcla de sueros de sujetos normales para seguir de cerca las condiciones de las primeras observaciones publicadas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Los cobayas fueron elegidos cuidadosamente para descartar los descendientes de cobayas inoculados antes con productos humanos. Los animales de cada lote fueron inyectados por vía intramuscular con orina normal.

recientemente emitida y preparada en la forma que a continuación indicamos para cada lote. La cantidad de orina inyectada a cada cobaya fué de 5 c. c. Cuando se administró el sedimento o el sobrenadante, fué siempre el correspondiente a 5 c. c. de orina. La sensibilización se hizo en una sola vez, dividiendo la cantidad total de la dosis en dos partes iguales, que se inyectaron intramuscularmente en cada pata posterior. Como ya se ha dicho, la inyección desencadenante se hizo por vía intravenosa, en la vena de la pata posterior, en dosis de 0,5 a 0,75 c. c. (según el peso del cobaya) de suero humano normal. El intervalo entre la inyección sensibilizante y la desencadenante fué de 30 a 34 días.

Lote 1.—Orina normal recientemente emitida.

Lote 2.—Orina normal filtrada por filtro Seitz.

Lote 3.—Orina normal dializada a través de membrana de celofán.

Lote 4.—Sedimento de orina normal neutralizado con NaOH.

Lote 5.—A un volumen de orina normal se añade un volumen de ácido tricloroacético al 20 por 100. El sobrenadante se pasa por papel de filtro y se neutraliza con NaOH. Se inyecta a los cobayos del lote 5 A. El precipitado se redissuelve en suero fisiológico y se neutraliza con NaOH. Se inyecta a los cobayos del lote 5 B.

Lote 6.—A un volumen de orina normal se añade un

volumen de ácido sulfosalicílico al 3 por 100. El sobrenadante se pasa por papel de filtro y se neutraliza con sosa. Se inyecta a los cobayos de lote 6 A. El precipitado se redissuelve en suero fisiológico y después de neutralizado con NaOH se inyecta a los cobayos del lote 6 B.

Lote 7.—La orina normal se acidifica con ClH hasta un pH 3,5. Se añaden entonces tres volúmenes de alcohol etílico de 96°. Se centrifuga y separa el precipitado del sobrenadante. Este último se calienta a 40° para evaporar el alcohol etílico y después de neutralizar con sosa se inyecta a los cobayos del lote 7 A. El precipitado se redissuelve en suero fisiológico y después de neutralizado se inyecta a los cobayos del lote 7 B.

Lote 8.—A un volumen de orina normal se añaden cuatro volúmenes de ácido perclórico en sol. M. 0,75. Se agita. A los diez minutos se centrifuga y se separa el precipitado, que es eliminado. El sobrenadante se pasa por papel de filtro y se le añade un volumen de ácido fosfotungstico al 5 por 100 en ClH 2N. A los quince minutos se centrifuga. El precipitado que resulta se redissuelve en suero fisiológico y tras adecuada neutralización se inyecta a los cobayos del lote 8 B. A su vez el sobrenadante se dializa, reduce su volumen por destilación al vacío y se inyecta a los cobayos del lote 8 A.

Lote	TIPO DE SENSIBILIZACION	Número de cobayas	Shock mortal	Shock lento con recuperación	Sin síntomas
1	Orina normal	7	4	3	0
2	Orina normal filtrada por filtro Seitz.....	3	0	0	3
3	Orina normal dializada por membrana de celofán	3	3	0	0
4	Sedimento de orina normal neutralizado con NaOH	5	5	0	0
5	Orina normal tratada con igual vol. de ácido tricloroacético al 20 por 100.				
5 A	Sobrenadante	2	2	0	0
5 B	Precipitado	3	0	1	2
6	Orina normal tratada con igual vol. de ácido sulfosalicílico al 3 por 100.				
6 A	Sobrenadante	1	1	0	0
6 B	Precipitado	2	1	0	1
7	Orina normal precipitada con tres vol. de alcohol etílico de 96°.				
7 A	Sobrenadante	3	0	0	3
7 B	Precipitado	3	1	2	0
8	Orina normal tratada con ácido perclórico M. 0,75. El sobrenadante se trata con ácido fosfotungstico al 5 por 100 en ClH 2N.				
8 A	Sobrenadante	3	0	0	3
8 B	Precipitado	3	0	3	0

RESULTADOS.

En el cuadro adjunto hemos resumido los resultados obtenidos, que clasificamos en: *shock mortal*, en el que los animales presentan inmediatamente después de la inyección desencadenante un cuadro típico de choque anafiláctico, muriendo entre 1' 30'' y 2'; *shock lento*: los cobayos tienen picor nasal y de orejas, disnea, contracciones diafragmáticas, dolores abdomi-

nales, hipotonía muscular, que les hace incluso caer sobre un costado, pero en un tiempo variable entre los 15 y 25 minutos se van recuperando poco a poco; finalmente, los que clasificamos *sin síntomas* son animales a los que la inyección no les afecta en nada o muy ligeramente.

De tales resultados puede deducirse que en la orina humana normal existe una sustancia fuertemente antigenica para el cobaya y de gran po-

tencia, ya que cantidades tan relativamente pequeñas como 5 c. c. de orina son capaces de sensibilizar anafilácticamente a estos animales provocando cuatro choques mortales y tres lentos en un conjunto de 7 cobayas a los que se inyecta la orina sin tratar y cinco choques mortales en 5 cobayas inoculados con el sedimento simple de esta orina. Tal sensibilización es muy duradera, ya que en otras experiencias la hemos visto persistir incluso al año y medio de haberse inyectado la orina.

Este antígeno no pasa el filtro Seitz, como puede verse en las experiencias con el lote 2, compuesto de 3 cobayas, ninguno de los cuales presenta síntomas tras la inyección de suero humano. No se pierde dializando la orina por una membrana de celofán (lote 3). El ácido tricloroacético, que prácticamente precipita todas las proteínas de la orina, no precipita a este antígeno urinario, ya que queda en el sobrenadante como puede verse en las experiencias con el lote 5: dos cobayas inyectados con el sobrenadante tienen choque mortal y, en cambio, de los tres animales inyectados con el precipitado del ácido tricloroacético sólo uno tiene choque lento y en los otros dos no hay síntomas. Algo parecido ocurre con la orina tratada con ácido sulfosalicílico: un cobaya al que se le administra el sobrenadante presenta choque mortal y de dos animales inyectados con el precipitado uno muere y otro no tiene síntomas. Aquí, sin embargo, parece que el antígeno, por lo menos en parte, es arrastrado por el ácido sulfosalicílico. El alcohol etílico lo precipita (lote 7), así como el ácido fosfotungstico, en una orina previamente desproteinizada con ácido perclórico, como puede verse en la experiencia con el lote 8.

DISCUSIÓN.

Aunque el número de cobayas empleados en estas experiencias es pequeño, nos permiten, sin embargo, observar algunos hechos interesantes. No cabe duda que la orina humana normal contiene una poderosa sustancia antigénica para el cobaya que está relacionada con otra sustancia contenida en el suero humano, puesto que el desencadenamiento del choque se hace con éste último. Pensamos en un principio que tal antígeno urinario estuviera constituido por las proteínas que existen, en pequeña cantidad, en todas las orinas normales. Pero en las orinas desproteinizadas con el ácido tricloroacético, sulfosalicílico o perclórico, persiste tal antígeno aunque parte de él sea arrastrado en la precipitación proteica con tales ácidos y sea la causa de que no se obtenga choque mortal en algunos de los cobayas inyectados con los sobrenadantes y sí en cambio un choque lento. Aunque no podamos afirmar aún nada concreto, es posible que pueda tratarse de una mucoproteína, como lo prueba el que sea precipitable por el ácido fosfotungstico, que, como es sabi-

do, es el precipitante adecuado de las mucoproteínas. En este sentido son interesantes los trabajos de HAMERMAN, HATCH, REIFE y BARTZ², los cuales estudian por métodos cromatográficos y analíticos los componentes de la orina normal tras dialización y concentración de la misma, encontrando que la mayor parte de los llamados "sólidos urinarios no dializables" están constituidos por una mezcla de carbohidratos y proteínas, formando mucoproteínas de elevado peso molecular.

A la luz de estas observaciones podemos explicarnos, de manera distinta a como entonces lo hacíamos, las experiencias anteriormente comunicadas¹. Lo que llamábamos choque paraspecífico era en realidad un auténtico choque anafiláctico, en el que el antígeno sensibilizante, orina u otros productos humanos, había provocado una fuerte sensibilización en los cobayas, que se transmitió a sus descendientes por vía placentaria. Al ser éstos inyectados con ovalbúmina, seguían, naturalmente, siendo sensibles al primer antígeno. Por eso, al administrarles por vía intravenosa suero humano, se producía un choque anafiláctico para los productos humanos, pero sus tejidos no se descargaban de los anticuerpos antiovalbúmina, lo que se demostraba provocando la contracción de la tira uterina o del ileón terminal al ponerles en contacto con albúmina de huevo.

Las diferencias que observábamos entre los sueros normales y alérgicos no podemos explicarlas en la actualidad si no es recurriendo a la hipótesis de que el antígeno desencadenante, presente en el suero humano normal, falle o esté descaracterizado en el suero de los sujetos alérgicos. En disyuntiva, otra explicación sería que casualmente hubiéramos inyectado los sueros alérgicos a cobayas no descendientes de animales previamente inoculados.

CONCLUSIONES.

1. Se demuestra que en la orina humana normal existe una sustancia fuertemente antigénica para el cobaya.
2. Esta sustancia no es dializable a través de membranas de celofán y es retenida por el filtro de Seitz.
3. No es una sustancia proteica propiamente dicha, ya que no es precipitable, por lo menos en su totalidad, por los ácidos tricloroacético, sulfosalicílico y perclórico.
4. Parece que es precipitable por el alcohol y el ácido fosfotungstico, por lo que es posible que se trate de una mucoproteína.
5. En el suero humano normal existe una sustancia antigenicamente similar, ya que en los cobayas sensibilizados con orina se desencadena un choque anafiláctico mortal al inyectarles suero humano por vía intravenosa.

BIBLIOGRAFIA

1. C. JIMÉNEZ DÍAZ, J. M. SEGOVIA y J. M. ALÉS.—Rev. Clin. Esp., 55, 159, 1954.
 2. D. HAMERMAN, F. T. HATCH, A. REIFE y K. W. BARTZ.—J. Lab. Clin. Med., 46, 848, 1955.

SUMMARY

Normal human urine is shown to contain a substance markedly antigenic to guinea pigs. This substance is not dialyzable through cellophane membranes and is retained by Seitz filters.

It is not a protein proper, in that it is not precipitable (at least in its entirety) by trichloroacetic, sulfosalicylic and perchloric acids.

It appears to be precipitable by alcohol and phosphotungstic acid. Thus it is possible that it is a mucoprotein.

In normal serum there is an antigenically similar substance, since in urine-sensitised guinea pigs a lethal anaphylactic shock occurs on intravenous injection of human serum.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird erwiesen, dass der normale menschliche Harn eine für das Meerschweinchen stark antigenische Substanz enthält.

Diese Substanz ist nicht durch die Zellophan-membranen dialysierbar und wird vom Seitzfilter aufgehalten.

Es handelt sich um keine ausgesprochen proteische Substanz, da dieselbe weder durch Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure noch Hyperchlorsäure präzipitierbar ist, zumindest nicht gänzlich.

Hingegen scheint die Fällung durch Alkohol und Phosphorwolframsäure möglich zu sein, wonach zu vermuten ist, dass es sich um ein Mukoprotein handelt.

Eine antigenisch gleichartige Substanz ist im normalen menschlichen Serum enthalten, wonach durch intravenöse Verabreichung desselben an mit Harn sensibilisierten Meerschweinchen ein tödlicher anaphylaktischer Schock hervorgerufen wird.

RÉSUMÉ

On démontre l'existence dans l'urine humaine d'une substance fortement antigénique pour le cobaye.

Cette substance n'est pas dialysable à travers des membranes de célophane et est retenue par le filtre Seitz.

Il ne s'agit pas d'une substance protéique proprement dite, puisqu'elle n'est pas précipitable, tout au moins dans sa totalité, par les acides trichloroacétique, sulfosalicylique et perchlorique. Elle semble précipitable par l'alcool et l'acide phosphotungstique, c'est pourquoi on pense qu'il s'agit d'une mucoprotéine.

Dans le sérum humain normal, il existe une

substance antigéniquement semblable, puisque dans les cobayes sensibilisés avec de l'urine, il se déclenche un choc anaphylactique mortel, lorsqu'on leur injecte du sérum humain par voie intraveineuse.

CULTIVO DE LAS ESPORAS EN EL AIRE DE LAS PALMAS

C. R. GAVILANES.

Instituto Canario de Medicina Regional.
 Médico Director: C. R. GAVILANES.

En el presente trabajo estudiamos la proporción de esporas de hongos existentes en el aire de Las Palmas.

MATERIAL Y MÉTODO.

Se han hecho siembras en placas de Petri de 10 cm. de diámetro conteniendo medio de Elsworth de agar-maíz. Las siembras se hicieron en la azotea de nuestra casa, situada en el centro de la población, orientada hacia el Este y a unos 200 metros de la costa. La casa tiene, aproximadamente, 30 metros de altura y las placas se exponían, enfrentándolas con el viento, a 1,75 metros sobre el suelo durante cinco minutos. Se cerraban luego con esparadrapo y se dejaban germinar a la temperatura ambiente tiempos variables entre cinco y siete días. Es de señalar que por la orientación de nuestra vivienda los vientos procedentes del E. apenas recorren tierra y se pueden considerar como marinos; los de dirección N. O.-S. E. atraviesan una franja de tierra de unos ocho kilómetros abundante en jardines; los de dirección O.-E., atraviesan la Isla, pero por estar la ciudad protegida en esta dirección por un talud de unos 200 metros, las esporas suspendidas en el aire deben sobrevolarla en una buena parte y caer al mar; esta suposición no la hemos comprobado para los hongos, pero sí para los polenes, en colaboración con MONSERRAT.

Finalmente, los vientos de dirección de S.-N. y los S. E.-N. O. atraviesan una zona muy rica en cultivos de tomates y plátanos de la vega de Telde y zonas desérticas, abundantes en Opunthias, Euphorbias y palmeras.

También es de interés señalar que la dirección más frecuente, casi única del viento, en relación con el aislamiento, es la N.-S. y N. O.-S. E.; sólo excepcionalmente, diez o quince días al año, la dirección del viento es S. E.-N. O., o francamente E.-O. o S.-N. Es el llamado levante y viento del sur, procedente del desierto y en consecuencia cálido y seco. Estudios estadísticos previos nos han mostrado que este tipo de clima desarrolla con gran frecuencia crisis intensas de asma.

Aunque en nuestro estudio consta la relación entre el número y género de las colonias cultivadas y las condiciones climáticas, no incluimos las correspondientes tablas para no alargar excesivamente esta exposición.

RESULTADOS.

Se sembraron con la técnica ya descrita 124 placas en otros tantos días, cultivándose un total de 1.782 colonias, lo que corresponde a 14,3 colonias por placa. En la tabla I detallamos los resultados.