

Nuevo método para la preparación de sueros en gran escala

POR EL DR. A. SORDELLI

Todo el que se haya ocupado de la producción de sueros, ha debido contar como factor muy importante además de la inmunización, la manipulación de la sangre y la obtención del suero después de sangrado el animal.

En el mejor de los casos, cuando la sangre coagula bien, el coagulo se retrae, los glóbulos se sedimentan y el suero no se hemoliza, se alcanza un rendimiento que rara vez pasa del 40 % de suero claro.—Desgraciadamente este caso no es muy constante y menos aún en los caballos sangrados a blanco cuya sangre muestra casi siempre esta curiosa propiedad: las primeras fracciones coagulan bien y el coagulo se retrae, a medida que la sangría progresa la coagulabilidad disminuye, el coagulo no se retrae y en las últimas no se separa fibrina, sedimentándose los glóbulos y sobrenadando plasma. En esta forma suele permanecer días enteros y recién el calentamiento provoca la separación del fibrinógeno.

Los inconvenientes expuestos que reducían considerablemente el rendimiento de suero en este Instituto, nos indujeron a ensayar nuevos procedimientos que permitieron subsanarlos.

Se ensayó con poco resultado la adición de sustancias que aumentarían la coagulabilidad de la sangre, empleándose suspensiones estériles en solución fisiológica de extractos alcohólicos de corazón de vaca, que actúan como citozima. En algunos casos el método se revelaba excelente, mientras en otros fracasaba.

Por último llegamos a adoptar el método que a continuación detallamos y que consiste simplemente en recoger sangre sobre oxalato de sodio, separar el plasma, coagularlo por Cloruro de calcio, inactivar el suero y luego filtrarlo.

1.º **Obtención del plasma.**—Se prepara una solución estéril de oxalato de sodio en agua destilada al 2,6 %. (1)

(1) Puede prepararse una solución de oxalato de sodio recurriendo al ácido oxálico cristalizado y al hidrato de sodio: 122 gramos de ácido oxálico se disuelven en 4 litros de agua y se añade poco a poco una solución de hidrato de sodio concentrada hasta que quede la solución neutra al papel de tornasol. Se completa luego a 5 litros y queda así una solución de oxalato de sodio al 2,6 %.

Para recojer la sangre se usan frascos de 5 litros de capacidad, que se esterilizan en autoclave o con una solución de fenol al 5 % durante 24 horas. En este último caso se quitan los restos del fenol, lavando el frasco con agua estéril. Se añade a cada frasco 200 c.c. de la solución de oxalato de sodio estéril (40 c.c. por cada litro de sangre a recojer), y se tapan con un grueso tapón de algodón, atravesado por un tubo de vidrio que llega al fondo del frasco, provisto de goma y cono de enchufe para trocar.

Se sangran los caballos como de costumbre agitando el frasco con un movimiento circular y cuidando de no hacer espuma que luego se hemoliza y enrojece el suero. Los animales destinados a sangría se sangran el mismo día, pues conviene que su número sea lo más grande posible para homogenizar los sueros. Si las sangrías son de suero antidiftérico, antitetánico, antiofídico o de otro suero susceptible de una medición exacta, se toma después de la sangría una muestra de plasma de cada frasco, para ser medido enseguida.

Una vez tomadas las muestras se colocan los frascos en la heladera donde los glóbulos se separan y dejan en la parte superior una capa de plasma que a las 48 horas es bastante claro.

En la práctica diaria procedemos en la siguiente forma para los sueros antitóxicos: después de 48 horas en que se conoce ya el resultado de la medición, se separan los sueros antidiftéricos o antitetánicos que tienen un valor antitóxico de 500 unidades, por lo menos, por c.c. (Ehrlich y N. A. respectivamente) los sueros antiofídicos que neutralizan 2,5 mgr. de *Lach. Alternatus* y 0.4 mgr. de *Crotalus terrificus*, por lo menos, por c. c. que pueden ser utilizados directamente sin concentración, mientras que los demás que están por debajo de los valores indicados se concentran.

Por medio de un sifón se separan los plasmas de los caballos que tienen el valor antitóxico mínimo y se mezclan todos en una olla esmaltada. Con los sueros no antitóxicos, aglutinantes, antiinfecciosos o normales se realiza la mezcla sin medir el valor del plasma pues ya se ha determinado por una sangría de prueba y es muy fácil obtener mezclas que estén dentro de los límites mínimos que uno fija por la desviación del complemento o la aglutinación. (1)

La separación del plasma se realiza por sifonamiento sin dificultad y con un buen sifón se puede retirar hasta los últimos restos del plasma. La operación conviene realizarla a las 48 o 72 horas después de la sangría. Antes se tropieza con el inconveniente

(1) Las muestras de plasma de los sueros antiofídicos (antilachesia, anticrotálico) se deben coagular antes de medirlas, pues sino casi siempre coagulan al añadir el veneno. Se añade para esto a cada 20 c. c. de plasma 0.05 de CaCl_2 , seco granulado o la cantidad equivalente de una solución concentrada de CaCl_2 , y una vez coagulado el plasma se obtiene el suero por expresión del coágulo.

niente de un plasma con mucha células y difícil de filtrar, aunque no es nunca un serio inconveniente y después de 72 horas con un plasma que coagula lentamente y del cual la fibrina no se separa en su totalidad. Este inconveniente se observa con más frecuencia en los sueros de los caballos sangrados a blanco.

El rendimiento del plasma es variable y depende de cada animal por la cantidad de glóbulos y la facilidad con que estos se depositan. Muy probablemente influye sobre la precipitabilidad de los glóbulos la cantidad de fibrinógeno que cada plasma contenga. Puede aceptarse como un valor muy próximo al término medio de muchas sangrías el 60 %. Es decir que de cada 5 litros de sangre recogida se obtiene 3 litros de plasma (1).

Las operaciones hasta aquí relatadas son comunes y conocidas en todas las fábricas de sueros que emplean la concentración en gran escala, de tal manera que solo las operaciones siguientes muy simples por cierto, forman parte de la técnica.

2.º **Coagulación del plasma.**—Es un hecho conocido y fácil de observar aparte de las diferencias esenciales que existen en el fenómeno de la coagulación del fibrinógeno por el calor (a temperatura próxima a 58º) y la coagulación del mismo por la trombina, que la filtración del suero obtenido por el primero de los métodos indicados es mucho más lenta y difícil que si el suero se ha obtenido por separación del fibrinógeno por acción de la trombina.

Basándonos en esta propiedad llevamos a cabo una modificación del método de concentración usado hasta entonces en nuestro Instituto y pudimos al mismo tiempo preparar sueros en la forma que en esta nota se describe.

A cada 1000 c.c. de plasma, contenidos en la olla esmaltada en que se mezclaran, se añaden 1,2 a 1,4 gramos de CaCl_2 ; con esto se consigue precipitar todo el ácido oxálico al estado de oxalato de calcio y dejar un pequeño exceso de calcio que permitirá la formación de trombina. Para acelerar la coagulación se coloca la olla en un baño-maría a 50º y se agita el contenido con una hélice hasta que el plasma llegue a 35º ó 36º. Se quita la olla del baño-maría y se observa atentamente hasta que se note la formación de fibrina. Se coloca de nuevo en el baño-maría y se agita lentamente, procurando que la fibrina que se forma se enrede en la hélice. Se ayuda la desfibrinación con unas paletas o con las manos, previamente bien lavadas; cuando se nota una interrupción en la separación de fibrina debe detenerse la agitación y el calentamiento. Se reconoce el fin de la coa-

(1) Sin tener en cuenta el oxalato añadido se puede calcular el 150 c.c., (50 c.c. para los glóbulos) y sin sifonar muy cuidadosamente, dejando siempre un poco de plasma en los frascos.

gulación en la clarificación del líquido y en que después de un momento de quietud no se forman más filamentos. La fibrina separada se prensa para separar el suero y el suero obtenido se añade al resto. Se calienta luego hasta 57°.

Se puede añadir fenol después de la coagulación en la proporción del 4 al 5 ‰. Solo es conveniente esta adición para los sueros que se inyectan en cantidades relativamente pequeñas. El fenol, coagula una parte de las proteínas y separa probablemente sustancias fácilmente precipitables, de suerte que los sueros fenicados, se conserven en buen estado durante largo tiempo.

3.º **Filtración.**—La filtración del suero se realiza en dos tiempos: Primero, a través de papilla de papel y luego a través de bujías estériles.

Para la primera filtración se utilizan filtros de porcelana de Büchner puestos en comunicación con un frasco y una trompa de vacío. Para la filtración de grandes cantidades se usa un número grande de filtros puestos en derivación sobre un tubo de vidrio.

Se prepara la papilla desmenuzando papel de filtro en agua hasta que esté bastante dividido. Luego se hace hervir y se cargan los filtros haciendo funcionar la bomba de vacío. Una vez que en cada filtro se haya depositado una capa de 5 mm. a 1 cm. de papel y se haya quitado la mayor parte del agua por succión, quedando apenas la papilla húmeda, se filtra el suero todavía bien caliente, en el caso que no se use conservador. En el caso contrario la filtración puede realizarse en cualquier momento.

Si el suero está bien privado de la fibrina, la filtración tiene lugar con mucha rapidez, pudiendo filtrar 50 litros en una hora sobre una superficie de 600 cm².

Simultáneamente con esta filtración se realiza la filtración por bujía estéril usando de preferencia la presión. Con bujías Berkerfeld (del tipo común usado para filtrar agua), se pueden filtrar 15 litros por cada una en espacio de 45 minutos, usando una presión de dos atmósferas. Las bujías no se obstruyen y no detienen las proteínas, la filtración es apenas un poco más lenta al final, y con sueros bien coagulados y clarificados por papel se puede filtrar una cantidad mucho mayor. Si los sueros no tienen fenol u otro conservador, pueden filtrarse una segunda vez por bujía estéril con lo que se asegura su esterilidad. Todas las operaciones realizadas después de la separación del plasma, coagulación, etc., deben ser hechas con precauciones de asepsia, por ejemplo: lavando todos los recipientes con fenol fuerte y luego con agua estéril, y deben terminarse todas las operaciones en el intervalo de pocas horas.

Generalmente para la elaboración de 50 litros de suero, dos personas emplean cuatro horas. La mayor parte de este tiempo

transcurre en la filtración. Para realizar ésta, usamos en la actualidad solamente 8 filtros Büchner de 10 cms. de diámetro y dos aparatos de filtración por bujía.

Una vez filtrados los sueros en frascos estériles se calientan en baño-maría a 56° durante 40 minutos quedando así listos para el envase.

Los sueros antiinfecciosos son medidos después del calentamiento para conocer su valor en aglutininas, amboceptores o bacteriotropinas. Los sueros antitóxicos de difteria o tétano son medidos después del calentamiento por los métodos comunes; con el suero antiofídico, se verifica si neutraliza por lo menos 2,5 mgrs. de veneno de *L. Alternatus* y 0,4 mgrs. de veneno de *C. Terrificus*.

Es condición importante para el éxito de la filtración comprobar la ausencia de fisuras en las bujías por el método común del aire comprimido (0,3 a 0,5 atmósferas).

En muchas bujías se puede comprobar el escape del aire por la unión de la bujía con la armadura metálica; este defecto es fácil de subsanar parafinando bien con una faja de 1/2 cm. alrededor del anillo en el momento de usar las bujías.

Una vez terminada la filtración, las bujías se ponen en agua que se renueva constantemente hasta el día siguiente, se colocan luego en una solución de NaOH al 1 % y se hierven por media hora. Se lavan haciendo pasar del exterior al interior, primero agua, luego agua acidulada débilmente y por último agua. Se secan en estufa y quedan así listas para ser esterilizadas.

El rendimiento final en suero, sin contar las pérdidas del envase, se puede calcular entre el 55 y el 60 % del volumen de sangre recogido, mientras con el sistema de coagulación usado anteriormente se alcanzaba apenas el 40 %.

CONCLUSIONES

Se describe un método para la obtención de suero de caballo que consiste en: recojer la sangre sobre oxalato de sodio, separar a las 48 horas el plasma, coagularlo por CaCl₂ y filtrar el suero rápidamente por bujía estéril.

Con esto se consigue una elaboración muy rápida de grandes cantidades de sangre, que permite la obtención de sueros uniformes y un rendimiento de suero que alcanza al 60 % de la sangre elaborada.

Además, en los ensayos realizados con estos sueros parece que se ha observado una proporción menor de casos de enfermedad sérica. Esta observación merece un estudio más detenido.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Beschreibung einer neuen Methode um Serum (für Fabrikszwecke) zu gewinnen.

Das Blut wird in Natrium oxalat aufgefangen und nachdem es während 48 Stunden abgesetzt ist, wird es mit CaCl_2 versetzt und durch Berkerfeld Kerzen filtiert. Mit dieser Methode gewiüt man eine bessere Ausbeute, welche 60 % des gesamtblutes beträgt.

Es ist wahrscheinlich dass die Serugkrankheit vermindert wird.

CONCLUSIONS

On décrit une méthode pour obtenir rapidement des grandes quantités de sérum de cheval, et avec un rendement qui arrive jusqu'à 60 % du volume du sang primitif.

Cette méthode consiste en recueillir le sang sur l'oxalate de soude, séparer le plasma au bout de 48 heures, le faire coaguler avec du Cl_2Ca et le filtrer finalement à travers une bugie stérile.

Les sérums ainsi obtenus sont très uniformes et ils produisent probablement moins fréquemment la maladie sérique. Cette dernière observation mérite d'être l'objet d'une étude plus minutieuse.

CONCLUSIONS

A method for elaborating horse-serum is herein described, viz: to collect blood on sodium oxalate, to withdraw plasma after 48 hours, to coagulate it by CaCl_2 , and rapidly to filter serum through a sterilized candle filter.

Large quantities of blood may be thus very rapidly elaborated allowing the obtainment of uniform serums, and a yielding reaching to 60 % of elaborated blood.

With these serums one may observe a lower proportion of serum disease. This conclusion deserves more particular attention.
