

Suero anti *Latrodectus* ⁽¹⁾

I. — OBTENCION Y PURIFICACION

Por PIROSKY IG., SAMPAYO R., y FRANCESCHI C.

La picadura de *Latrodectus* (**) provoca en el hombre un cuadro clínico de por sí dramático, cuya gravedad, en ciertas regiones, se traduce por una mortalidad de un 5 % (***) . Esta circunstancia y la amplia difusión de estos arácnidos, indujeron desde hace tiempo a investigar la naturaleza antigénica de estos venenos y la posibilidad de obtener un suero específico con fines terapéuticos.

(*) La preparación del suero anti *Latrodectus* nos ha sido propuesta por el Prof. B. A. HOUSSAY. Este trabajo no hubiera sido posible realizar sin la colaboración entusiasta del Sr. JORGE W. ABALOS, docente de la localidad de Colonia Dora, Provincia de Santiago del Estero, quien desde hace más de dos años remite en forma regular millares de arañas al Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires.

(**) Las arañas del género *Latrodectus* se hallan ampliamente distribuidas. Se las encuentra en el sur de Europa y Rusia (*Latrodectus tridecimguttatus*), donde se las denomina vulgarmente Malmignatte y Karakurt; en Nueva Zelandia (*Latrodectus Katipo*, Powell), en Australia (*Latrodectus Hasselti*), en Madagascar (*Latrodectus Menavodi*, Vinson). En el continente Americano se han descrito tres especies: *Latrodectus mactans* Fabr., *Latrodectus Geometricus* C. Koch y *Latrodectus Curacaviensis* Müller. La diferenciación de *L. mactans* y *curacaviensis* como especies no es un asunto resuelto.

(***) La picadura en el hombre produce un cuadro clínico de gran semejanza en todos los países. El conjunto de síntomas, síndrome neurotóxico, han permitido a BOGEN (3) y a BLAIR (4) deslindar el «arañismo» como una entidad clínica dentro de la medicina general. El último de los autores citados, habiéndose hecho picar, ha realizado un minucioso estudio clínico y concluye: «la picadura de la araña adulta hembra *Latrodectus mactans* es peligrosamente venenosa para el hombre». De acuerdo a este autor y al excelente análisis clínico realizado por GAJARDO TOBAR (5) puede resumirse la sintomatología como sigue: Reacción local insignificante o nula; con frecuencia se observa in situ una mancha roja vinosa con los orificios dejados por los queléceros. El dolor en el sitio de la picadura es constante. Sobreviene un período de calma, variable entre minutos y horas. Reparación del dolor con rápida diseminación del mismo. El dolor aumenta rápidamente, es violento, extenuante, alcanzando su máxima intensidad en la cintura, en las piernas y en

Con este propósito ya, Scherbina (1903)¹ y Konstanoff (1904)² consiguen inmunizar dos camellos con extractos de cefalotórax de karakurt (*L. tridecimguttatus*). El segundo de los autores obtiene un suero del cual 0,01 de cm³ protege al ratón blanco contra 5 d. m. m. (dosis mínimas mortales).

Houssay y Negrete (6) inmunizaron conejos sometiendo cada tres días a picaduras de *Latrodectus*. Troise (7) estudia el poder neutralizante de suero anti-*Latrodectus* obtenido en conejos inmunizados con triturados de glándulas; 0,05 de cm³ de uno de los sueros protegían al cavia contra 2 d. m. m. D'Amour (8) compara la acción protectora en animales, de un suero de convaleciente y de un suero de carnero hiperinmunizado (anti-*Latrodectus*); 0,25 cm³ del primero protegen a la rata contra 1 dosis, y 0,2 cm³ del segundo protegen al 50 % de las ratas contra 10 dosis medias mortales. Finlayson (9) prepara suero de conejo contra las tres especies de *Latrodectus* descritas en Sud Africa por Pichard (10): *L. geometricus*, *L. concinnus* y *L. indistinctus*. Los sueros obtenidos con las dos últimas especies tienen una acción precipitante y neutralizante cruzadas. A su vez, ensaya el efecto terapéutico en el hombre de un suero de carnero anti-*Latrodectus*, del cual 1 cm³ protege al cavia contra 150 d. m. m. Diez y ocho sujetos picados por *Latrodectus* fueron tratados con este suero por inoculación de 5 cm³ por vía intramuscular, a excepción de un caso grave que lo fué por vía intravenosa. Todos estos enfermos se recuperaron dentro de las 24 horas de inyectados, a pesar de hallarse algunos en colapso en el momento de iniciar el tratamiento. Posteriormente a esta serie, el autor observa tres casos fatales, que no habían sido tratados con suero. Smith Dorm y D'Amour (11) inmunizan un conejo y un carnero, inoculando a cada animal en el término de 11 semanas y 6 meses un total de 150 y 3.000 *Latrodectus* respectivamente. 1 cm³ del suero de conejo o de carnero protegen al 50 % de las ratas contra 4 y 5 dosis medias mortales. Maxianovich (12) inocula un equino durante 3 meses con veneno formolado de karakurt, con

los brazos. Con los dolores sobrevienen contracciones clónicas y movimientos espasmódicos intermitentes. Pared abdominal rígida, fuerte opresión precordial; sudores profusos, sialorrea y lagrimeo abundantes. Ligera elevación de la temperatura, hipertensión arterial acentuada, leucocitosis hasta de 18.000 y evidente nefritis aguda. Las crisis se suceden durante varios días hasta la convalecencia, caracterizada por dificultad en la marcha, fatiga física y mental.

La casuística nacional será motivo de estudio en la próxima Tesis del Doctorado del Sr. SAMPAYO R. Hasta el año 1916 puede consultarse la conferencia sobre « Arañas venenosas », Dr. B. A. HOUSSAY, 1ª Conf. Sudamericana de Higiene, Microbiología y Patología, 17-23-IX-1916.

antígeno incluido en lanolina, con antígeno fresco y finalmente, hace picar al animal con dosis repetidas de 100 arañas. Obtiene así un suero del cual 2 cm³ tienen acción curativa cuando son inyectados al cavia por vía subcutánea, 1 hora después de haber sido picado por 3 karakurt (*).

Sobre la base de los resultados experimentales y clínicos que anteceden puede decirse que la sueroterapia específica debe ser hoy el tratamiento de elección para la cura de la intoxicación provocada en el hombre por la picadura de *Latrodectus*, más aún si tenemos en cuenta la poca o ninguna eficacia de los fármacos estudiados por Houssay y Negrete (6) y de haberse ensayado ya — según Bogen (3)— setenta y cinco medicamentos sintomáticos.

A continuación exponemos: A) la técnica utilizada para la obtención de un suero anti *Latrodectus*; B) la posibilidad de concentrar y purificar en alto grado la antitoxina específica; C) los resultados obtenidos al estudiar la propiedad del suero de neutralizar el veneno y de curar la intoxicación experimental.

A) OBTENCIÓN DEL SUERO ANTI *Latrodectus*

1. *Conservación del antígeno.*— Hemos empleado cefalotórax de hembras adultas de *Latrodectus mactans* (fig. N° 1). La necesidad de mantener inalterado al antígeno, dado que las arañas nos

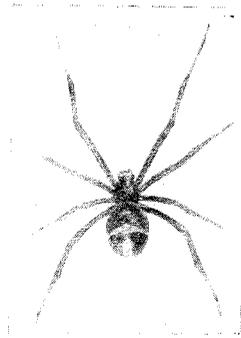


FIG. 1. — *Latrodectus Mactans* · 2x. Procedencia: Colonia Dora (Sgo del Estero).

eran remitidas mensualmente, hizo que ensayáramos diversos procedimientos para su mejor conservación. De las diferentes técnicas empleadas (congelación de los cefalotórax y cierre de los tubos al

(*) VITAL BRAZIL y VELLARD (13) prepararon suero anti-arácnido polivalente (*Ctenus nigriventer* y *Lycosa raptoria*) y comprobaron no sólo su poder protector en los animales de laboratorio, sino sus efectos curativos en un caso gravísimo de un hombre picado por *Ctenus*.

vacío, permanencia de las glándulas en vacío con ácido sulfúrico), hemos optado por la simple conservación de los cefalotórax en desecador entre 0 y 5°C con vacío en ambiente de ácido sulfúrico y potasa. En estas condiciones y separando el cefalotórax a medida que se recibían las arañas, hemos podido mantener prácticamente inalterada la toxicidad del antígeno. (Control hasta dos años).

2. *Inmunización.*—Un equino fué inoculado por vía subcutánea, a intervalos de siete días, con dosis progresivas de antígeno. Este se obtenía por triturado suave de cefalotórax en mortero es-

TABLA I

Inoculación semanal, por vía subcutánea, de extractos acuosos de cefalotórax. Un cefalotórax por cc. de solución fisiológica

Fecha	Número de cefalotórax	Fecha	Número de cefalotorax	Fecha	Número de cefalotorax
24. X. 1940 . .	1/2	19. III. 1941 .	10	1. X. 1941 . .	20
	1		10		40
	2		40		80
	4		40		120
	4		40		120
	6		36		200
	10		60	19. XI. 1941 .	200
	20		100		
	40		120		
31. XII. 1940 .	60		150		
			200		
			250		
			100		
		19. VI. 1941 . .	250		
Total inyect. .	145,5	Total inyect. .	1.436	Total inyect. .	820
Se interrumpe la inmunización por estomatitis vesicular.		Entre el 25. VI y 26. VI. 1941 se practican 3 sangrías de 6 litros, obteniéndose el suero serie N° 1.		Entre el 19. XI y 20. XI. 1941 se realizan 3 sangrías de 6 litros, obteniéndose el suero serie N° 2.	

téril e incorporación del producto en solución fisiológica al 0,8 % y fenol al 0,1 %, en la concentración de un cefalotórax por cm³.

Se controló la toxicidad de cada solución de antígeno por inoculación subcutánea de 0,5 y 1 cm³ a dos cavia de 250 gramos. La

dosis mínima mortal de las soluciones utilizadas para la inmunización del equino, ha estado comprendida entre estas cifras.

En la tabla I se consignan los detalles de las inmunizaciones realizadas.

Una primera serie, iniciada con $\frac{1}{2}$ cefalotórax el 24-X-1940 hubo de ser interrumpida con motivo de una epidemia de estomatitis vesicular que atacó al equino en experiencia. Reiniciada el 19-III-1941 finalizó a las 14 semanas, después de haber inyectado 1.436 cefalotórax. Con la sangría correspondiente se obtuvo el suero anti-*Latrodectus*, serie N° 1. Después de un intervalo de 3 meses se procede a una segunda inmunización que iniciada el 1°-X-1941 se da por terminada a las siete semanas, con 820 cefalotórax inoculados. Se obtiene así el suero, serie N° 2.

B) CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN

La antitoxina específica del suero anti *Latrodectus* se puede concentrar por precipitación por sales y por digestión enzimática.

1. *Concentración por sales.* — El suero tratado por sulfato de sodio al 22 % da un precipitado que contiene la mayor parte de su actividad. Redisueltas las globulinas precipitadas en un volumen igual al tercio del original se ha conseguido concentrar 2,2 veces el valor antitóxico del suero primitivo. La valoración se ha realizado con mezclas de 12 dosis mínimas mortales de veneno más cantidades variables de suero. Estas mezclas, incubadas 1 hora a temperatura de laboratorio (22°C) y contenidas en 0,5 de cm^3 fueron inyectadas por vía intravenosa al ratón blanco de 15 a 20 gramos de peso. Se han utilizado 5 ratones por dosis. Se considera como valor, aquel que determina, en el término de 3 días, el 50 % de mortalidad. En estas condiciones el suero primitivo de la serie N° 1 tiene un valor de protección igual a 0,022 de cm^3 ; este suero, concentrado por sulfato de sodio, alcanza un valor de 0,010 de cm^3 (tabla II). Es decir que 1 cm^3 del suero primitivo de esta serie protege al 50 % de los ratones contra 544,8 dosis mínimas mortales y 1 cm^3 de suero de esta misma serie, concentrado por sulfato de sodio lo hace contra 1.200. El contenido en proteínas del suero primitivo y del concentrado es de 6,93 y 11,33 gramos por ciento respectivamente; si consideramos el número de dosis mínimas mortales neutralizadas por gramo de proteína de cada uno de estos sueros resultan los valores de 7860 y 10.584; el índice de purificación es de 1,35 (tabla III).

2. *Purificación por digestión enzimática.* — Hemos utilizado el método de la digestión péptica y de la termocoagulación diferencial (método de Pope). El suero de la serie II así obtenido presenta las características de fluidez y estabilidad de las antitoxinas elaboradas con esta técnica. El valor de neutralización del suero primitivo de la serie II, determinado en las condiciones enumeradas

TABLA II

Neutralización de veneno Lactrodectus mactans por suero específico. Mezclas de 12 d.m.m. de veneno y cantidades variables de suero contenidas en 0,5 cc. e inyectadas por vía venosa al ratón blanco de 15 a 20 grs.; las mezclas son incubadas 1 hora a temperatura de laboratorio ($\pm 22^{\circ} C$). La solución de veneno ha sido preparada incorporando en solución fisiológica el triturado de cefalotórax de Lactrodectus mactans en la concentración de 8 cefalotórax por cc. La dosis mínima mortal de esta solución es de 0,0065 cc.

Sueros anti-Latrodectus	Volumen (c.c.)		Número de ratones inyectados para cada dosis	Observación
	Suero	Veneno		Muerte total inoculados
Serie I.				
	0,025			0/5
Primitivo	0,020	0,08	5	4/5
	0,016			5/5
Concentrado por sulfato sodio	0,013			1/5
	0,010	0,08	5	2/5
	0,008			5/5
Serie II.				
	0,025			0/5
Primitivo	0,020	0,08	5	3/5
	0,016			5/5
Purificado por digestión péptica	0,005			0/5
	0,004	0,08	5	2/5
	0,0032			3/5
	0,0025			5/5

en el párrafo anterior, es igual a 0,02 de cm^3 y el del suero digerido de la misma serie es de 0,004; teniendo en cuenta los volúmenes respectivos y los valores extremos de neutralización habría una pérdida del 45 % (tabla II).

El suero primitivo de la serie II contiene 7,2 % de proteínas y 1 cm^3 del mismo protege al 50 % de los ratones blancos contra 600 dosis mínimas mortales. Después de la purificación enzimática el

contenido en proteínas es de 6,05 % y 1 cm³ protege contra 3.000 d. m. m. Si consideramos el valor de protección por gramo de proteína, el suero primitivo serie II, neutraliza 8.328 y la misma serie purificada por digestión protege contra 49.584 dosis mínimas mortales; de ello resulta un índice de purificación de 6 (tabla III).

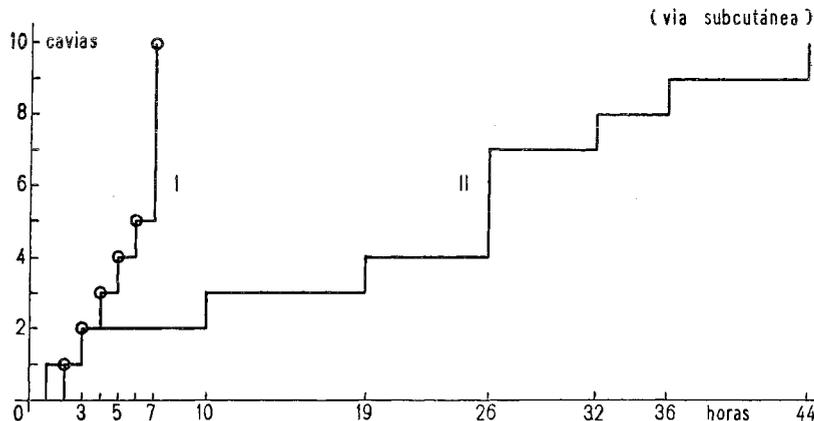
TABLA III

Sueros anti- <i>Latrodectus</i>	Proteína %	Dosis mínimas mortales de veneno neutralizadas por		Índice de purificación
		1 c.c. de suero	1 gramo de proteína	
Serie :				
Primitivo	6,93	544,8	7.860	1,35
Concentrado por sulfato sodio	11,33	1.200	10.884	
Serie II:				
Primitivo	7,2	600	8.328	6,—
Concentrado por digestión péptica	6,05	3.000	49.584	

C) PODER CURATIVO DEL SUERO EN LA INTOXICACIÓN EXPERIMENTAL POR EL VENENO DE *Latrodectus mactans*

El poder curativo del suero ha sido estudiado determinando el intervalo de tiempo dentro del cual es posible proteger un lote de animales previamente inoculados con veneno de *Latrodectus mactans*.

GRAFICO 1 - Curva I: distribución de muerte de 10 cavia, inyectado c/u. con 40 D.M.M.
Curva II: id. id. id. id. 4 D.M.M.



En estos experimentos solo fueron utilizados cavia de 250 grs. Al mismo tiempo que se inoculaban los animales destinados al en-

sayo de protección, se determinaba la dosis mínima mortal de la solución de veneno, la dosis mínima neutralizante —por mezclas «in vitro» e inoculación al cavia— del suero en estudio, así como la curva de distribución de muerte determinada por la dosis de veneno empleada.

TABLA IV

Poder curativo del suero anti-Latrodectus serie II, purificado por digestión péptica. Cavia de 250 grs. inoculados por vía subcutánea con 1 cc. de solución de veneno conteniendo 40 d. m. m. Sueroterapia por vía intravenosa.

Lote	Cavia No	Solución de veneno Latrodectus	Suero (vía venosa)		Observación 4 días
			Intervalo de tiempo	Volumen	
Testigos ...	49	1 c.c. = 40 d. m. m.	1 hora	<i>anti-estreptocócico</i> 2 c.c.	muerte en las 24 hs.
	53				
	92				
1	68	1 c.c.	1 h. 45	<i>anti-Latrodec.</i> 2 c.c.	Sobreviven
	84				
	47				
	3				
	50				
2	46	1 c.c.	2 horas	1 c.c.	Sobrevive » Muere 48 hs. Sobrevive » »
	83				
	57				
	27				
	30				
3	87	1 c.c.	4 horas	2 c.c.	mueren antes de la aplicación del suero
	72				
	21				
	69				
	2				
82					
14					
62					

Un cm³ de la solución veneno contenía 40 d. m. m. y éstas eran neutralizadas por 0,065 cm³ de suero de la serie II purificado por digestión. Por otra parte, la distribución de las muertes, de un lote de 10 cavia, inoculados con 1 cm³ de la solución de veneno por vía subcutánea, se realiza en el intervalo de siete horas. (Gráfico I, curva N° I).

Un lote de 21 caviae fué inyectado por vía subcutánea con 1 cm³ de la solución de veneno; de estos animales, 3 fueron inoculados por vía venosa (vena safena) a intervalo de 1 hora, con suero nor-

TABLA V

Poder curativo del suero anti-Latrodictus serie II, purificado por digestión. Caviae de 250 grs. inoculados por vía subcutánea con 1 c.c. de solución de veneno conteniendo 4 d. m. m. Sueroterapia por vía subcutánea y en un punto alejado del sitio de inyección del veneno.

Lote	Cavia No	Solución de veneno Latrodectus	Suero (subcutáneo)		Observación 4 días
			Intervalo de tiempo	Volumen	
Testigos	672	1 c.c. = 4 d. m. m.	1 hora	anti- estreptocócico 2 c.c.	mueren en las 24 hs.
	665				
	623				
1	693	1 c.c.	1 hora	anti- <i>Latrodectus</i> 0,5 c.c.	Sobreviven
	633				
	696				
	647				
	634				
2	677	1 c.c.	1 h. 30	0,5 c.c.	»
	692				
	694				
	653				
	682				
3	685	1 c.c.	2 horas (enfermos)	0,5 c.c.	»
	680				
	684				
	607				
	615				
4	654	1 c.c.	2 hs. 30 (enfermos)	0,5 c.c.	»
	613				
	699	1 c.c.			
	666				
5	695	1 c.c.	2 hs. 30 (enfermos graves)	0,5 c.c. (intravenoso)	»
	676				
	642				
	661				

mal y los restantes distribuidos en grupos de 6, fueron tratados a diferentes intervalos, por vía venosa, con suero específico (tabla IV).

La sueroterapia específica, realizada en este caso con el suero serie II, purificado por digestión, aplicada hasta 98 minutos después de haber inyectado 40 dosis mínimas mortales, protege prácticamente a todos los caviás de la intoxicación aguda provocada por el veneno de *Latrodectus mactans*. En este experimento, el tercer grupo de 6 animales, destinado a ser tratado cuatro horas después de la intoxicación, muere antes de aplicársele el suero.

En una segunda experiencia se utilizó una solución de veneno con 4 dosis mínimas mortales por cm^3 , neutralizadas por 0,008 de cm^3 de suero, serie II, purificado por digestión. Diez caviás inyectados por vía subcutánea con 1 cm^3 de esta solución de veneno, mueren dentro de las 48 horas de haber sido inoculados y la distribución de muertes se halla expresada por la curva II del gráfico N° 1. La curación se realiza sobre un lote de 28 caviás intoxicados por vía subcutánea por 1 cm^3 de veneno. Tres de los animales son utilizados para control, y los restantes se distribuyeron en grupos de cinco. Una hora después y a diferentes intervalos, son reinoculados con 0,5 cm^3 de suero, serie II, purificado por digestión. Todos los animales fueron reinyectados por vía subcutánea, a excepción del último grupo, que lo fué por vía venosa, dada la intensidad de los fenómenos tóxicos. Como se indica en la tabla V, los animales testigos, tratados con suero inespecífico, mueren dentro de las 24 horas, sobreviviendo en cambio la totalidad de los animales tratados con suero anti *Latrodectus*, a pesar de hallarse manifiestamente enfermos en el momento de recibir el suero, los caviás de los dos últimos grupos.

RESUMEN

Se ha inmunizado un equino por vía subcutánea con cefalotórax de *Latrodectus mactans*, triturados y suspendidos en solución fisiológica. En una primera inmunización, se emplearon 1.436 cefalotórax distribuidos en 14 semanas y en una segunda inmunización se utilizaron 820 cefalotórax en 7 semanas.

La antitoxina específica del suero anti *Latrodectus* ha podido ser concentrada por precipitación por sulfato de sodio con un índice de purificación de 1,35, o purificada por digestión péptica (método de Pope) con un índice de purificación de 6. Un cm^3 de este último suero protege al 50 % de los ratones blancos contra 3.000 dosis mínimas mortales y un gramo de proteína protegería contra 49.584 d. m. m.

La concentración y purificación de la antitoxina *Latrodectus* por digestión péptica nos ofrece la posibilidad de realizar en el hombre

la sueroterapia de la intoxicación por picadura de dicho arácnido, con las ventajas ya observadas en la aplicación de otras antitoxinas obtenidas por este método, entre otras, disminución del volumen a inyectar por elevada concentración de las antitoxinas, mayor velocidad de difusión y reducción a un porcentaje mínimo de las reacciones secundarias provocadas por los sueros corrientes.

BIBLIOGRAFIA

1. SCHERBINA: Citado por KONSTANSOFF.
2. KONSTANSOFF, S. V.: *Vesnik Vrach.* **18**: 156, 1906.
3. BOGEN, E.: *Archives of Intern. Medicine.* **38**: 623-632, 1926.
4. BLAIR, A. W.: *Archives Intern. Medicine.* **54**: 831-843, 1934.
5. GAJARDO TOBAR, R.: *Revista Médica de Chile.* **69**: Nº 11: 707-713, 1941.
6. HOUSSAY, B. A. y NEGRETE, J.: *Rev. Instit. Bacteriológico Dep. Nac. Higiene.* **2**: 189-200, 1919.
7. TROISE, E.: *Rev. Soc. Arg. Biol.* **4**: 467-475, 1928.
8. D'AMOUR, E. F.: *Proceed. Exper. Biol. and Med.* **35**: 262, 1936.
9. FINLAYSON, M. H.: *The Jour. Med. Assoc. South. Afr.* **10**: 43-45, 1936; **10**: 735, 1936; **11**: 163-165, 1937.
10. PICHARD-CAMBRIDGE: *Ann. S. A. Museum.* 143, 1904.
11. SMITH DORM y D'AMOUR, E. F.: *Proceed. Exper. Biol. and Med.* **40**: 686-687, 1939.
12. MAXIANOVICH, M. I.: *Medizinskaia Parazitologia y Parazitarnyia Bolezni,* **8**: 51-53, 1939.
13. VITAL BRAZIL y VELLARD, J.: *Memorias do Instituto Butantan.* **2**: 3-75, 1925; **3**: 3-59, 1926.