

Medición del suero anti-*perfringens* (*B. Welchii*)

Por A. Sordelli y J. Ferrari

(PRIMERA COMUNICACIÓN.—SEGUNDA PARTE)

En la parte anterior de esta comunicación hemos descrito un método de medición del suero anti-*perfringens* fundado sobre el empleo de una toxina precipitada por el sulfato de amonio y la inoculación intraperitoneal a la cobaya. Nos ocuparemos en esta segunda parte de la aplicabilidad del método y de algunos problemas que se han presentado en el curso de estos estudios.

a). La titulación del suero test 809 con la toxina *perfringens* IV, de la que se adoptaron 10 D. M. M. como dosis test, dió los resultados protocolizados en la pág. 548 que prueban que la dosis de suero que neutraliza totalmente 100 mgs. de toxina es la de 3.5 mgs. La dosis de 3 mgs. para la misma cantidad de toxina da una mezcla tóxica.

Las cantidades absolutas inyectadas a cada cobaya son:

Mezcla neutra: g. 0.060 de toxina + g. 0.0021 suero test 809
» tóxica: g. 0.060 » + g. 0.0018 » » »

La diferencia entre ambas dosis de suero es del 15 %. No hemos investigado si es posible una mayor aproximación. Creemos que para fundar el método es suficiente esta exactitud.

Las determinaciones de los valores consignados en las tablas (pág. 548) del trabajo anterior fueron hechas con el suero test disuelto en la mezcla de glicerina y solución fisiológica de manera igual que la usada para los sueros antidiftérico y antitetánico test.

La misma solución fué reproducida de la siguiente manera: 0.500 g. de suero seco se disuelven en 8.5 cm.³ de solución fisiológica y luego se añade glicerina hasta completar el volumen de 25 cm.³ a 15° y se filtra para separar un residuo insoluble.

Cada centímetro cúbico de esta solución contiene 0.20 grs. de suero seco. De una dilución de 1 cm.³ con 9 cm.³ de solución

fisiológica se toman las cantidades necesarias para realizar la siguiente medición que reproduce exactamente la anterior ya mencionada, esto es que 100 mgs. de toxina son neutralizados por 3.5 mgs. de suero.

g de suero 809	g de toxina IV	Resultado
0.0015	0.060	+ en la noche
0.0015	0.060	+ en la noche
0.0018	0.060	+ en la noche
0.0018	0.060	+ en la noche
0.0021	0.060	Vive.
0.0021	0.060	Vive.

b). Adoptada como dosis test de suero la de 1.8 mgs. se realizó una determinación de la toxina IV con un intervalo de aproximación del 8 % y al mismo tiempo se determinó la dosis test de una nueva toxina III. El protocolo siguiente reproduce los resultados de esa experiencia: a 4 cm.³ de solución de suero test conteniendo 0.80 gs. de suero seco se añaden 40.44 cm. de sol. fisiol. de tal manera que cada cm.³ contenga 0.0018 de suero seco. La toxina es diluída de tal modo que contenga 50 mgs. por cm.³.

La dosis test de la toxina IV es de 60 mgs. y la de la toxina III es de 65 mgs.

26 - VII

Suero 809	Toxina IV	Resultado	Suero 809	Toxina III	Resultado
0.0018	0.070	+	0.0018	0.070	+
0.0018	0.070	0?	0.0018	0.070	+
0.0018	0.065	+	0.0018	0.065	+
0.0018	0.065	+	0.0018	0.065	+
0.0018	0.060	+	0.0018	0.060	
0.0018	0.060	+	0.0018	0.060	
0.0018	0.055		0.0018	0.055	
0.0018	0.055		0.0018	0.055	
0.0018	0.050		0.0018	0.050	
0.0018	0.050		0.0018	0.050	
0.0018	0.045				
0.0018	0.045				

Los resultados con la sola excepción de una cobaya, con la dosis de 70 mgs. son muy regulares y revelan la semejanza de comportamiento de dos toxinas obtenidas en tiempos diferentes. El parecido es tal que hasta la dosis test resulta casi la misma en ambas.

c). La titulación de estas dos toxinas nos permite comparar con la dosis test de cada una, varios sueros. Dos de ellos el 809 y el 657 son sueros sin concentrar y el tercero 902 concentrado por el sulfato de sodio.

7- -VIII - 28

Suero 809	Toxina IV	Resultado	Toxina III	Resultado
1/25	+ 0.060 tox. IV—108-190	0	0.065 tox. III—199-200	0
1/30	176-190	0	3-200	0
1/35	17-190 +	8	189-200 +	8
Suero 657				
1/50	+ 0.060 tox. IV—175-200	0	0.065 tox. III—138-190	0
1/55	58-220 +	8	57-190 +	8
1/60	190-200 +	8	72-200 +	8
1/70	186-200 +	8	27-210 +	8
Suero 902 Conc.				
1/80	+ 0.060 tox. IV—100-200	0	0.065 tox. III—182-200	0
1/100	58-200	0	162-190	0
1/120	20-200 +	8	120-210	0
1/150	5-200 +	8	187-200 +	8
1/175	75-190 +	8	101-200 +	8
1/200	174-190 +	8	191-200 +	8

La cantidad de suero usada es 1 cm.³ de las diluciones indicadas en cada caso. Los resultados son concordantes con la excepción del suero 902 que neutraliza la toxina IV con un cm.³ de la dilución 1/100 y a la toxina III con la 1 cm.³ de la dilución 1/120. La experiencia no fué repetida, siendo por lo tanto imposible establecer si la hipersensibilidad o resistencia de algunas de las cobayas, o el método mismo fueron causa de la diferencia.

La certeza de los resultados se reduce mucho por esa circunstancia y la experiencia revelará si es conveniente el empleo

de dos animales inyectados con cada dosis, para disminuir esa causa de error.

La impresión recogida en el uso corriente del método, es de que la diferencia se debe a una causa accidental.

d). Se acepta generalmente que la causa más importante del poder patógeno del *B. Welchii* reside en la toxina segregada y que por lo tanto su neutralización debe ser suficiente para disminuir o anular dicho poder patógeno. Si esta opinión es correcta, debe existir un paralelismo entre el poder antitóxico y el anti-infeccioso de los sueros. Esto ha sido supuesto por varios autores y en general se acepta como un hecho probado.

En nuestro caso hemos tratado de averiguar si con el método de medición antitóxica propuesto anteriormente se podía determinar una cifra que estuviera en concordancia con el valor anti-infeccioso. Al mismo tiempo se trató de establecer si este comportamiento igual se observaba con sueros obtenidos por inmunización con una toxina de 12 horas de incubación y otra de tres días.

Se utiliza: suero de caballo 525 (inmunizado con toxina de 12 horas de incubación) y cuya medición con toxina seca por vía peritoneal utilizando 5 D. M. M. da para 1 cm.³ un valor de neutralización de 550 D. M. M., y suero de caballo 449 (inmunizado con toxina de 3 días de incubación) del cual la medición practicada en las mismas condiciones da un valor de neutralización igual a 450 D. M. M.

El cultivo empleado es de caldo con carne de 20 horas de incubación filtrado por algodón, del cual se usa como dosis 0.25 cm.³.

La dilución del suero y del cultivo se hace con caldo. El volumen final es completado con caldo. La mezcla se inyecta enseguida por vía intramuscular en cobayas.

17 - IV - 28

		Suero 449			Suero 525			
0.25 cultivo +		0.25	350-200	p. ed. 0 0 0	0.25 cultivo +	0.20	391-200	p. ed. 0 0 0
		0.20	343-200	ed. ed.		0.15	318-190	ed. ed.
		0.15	336-210	ed. ed.		0.10	314-200	ed. ed.
		0.10	370-200	ed. ed.		0.07	352-210	ed. ed.
		0.07	312-200	ed. ed.		0.05	335-200	+ 18
		0.05	328-210	+ 18		0.03	304-200	+ 18
		0.03	333-200	+ 18		0.02	320-200	+ 18
		0.02	324-190	+ 18		0.015	348-20	+ 18
	0.015	353-200	+ 18					

La medición del poder patógeno del cultivo utilizado en estas experiencias es:

17 - IV - 28

0.10	351 - 205 gs.	+ 18
0.07	399 - 200	+ 18
0.05	357 - 200	+ 18
0.03	311 - 200	g. ed + 19
0.02	340 - 210	+ 18
0.015	378 - 200	g. ed + 19
0.01	359 - 200	ed + 19
0.007	325 - 190 g. ed.	g. ed. ed.+21

El protocolo revela que la actividad del suero 525 es superior a la del suero 449 en la proporción de las dosis 0.20 a 0.25 que si no es exactamente la de los valores hallados con toxina por lo menos guarda una relación que en experimentos de esta índole puede considerarse satisfactoria.

También y probablemente por una coincidencia la cantidad de dosis mortales que 1 cm.³ de suero neutraliza, sea de toxina o de cultivo, es la misma.

e). Disponiendo de un método que permite la determinación exacta del valor antitóxico del suero anti-*perfringens* procuramos ante todo de que el suero antigrangrenoso preparado tuviera un valor constante para el *B. Welchii*.

Investigamos luego la variación del poder antitóxico de los distintos caballos, hallando valores muy diferentes (ver protocolo siguiente).

Estos datos indican inmediatamente la conveniencia de elegir solo los sueros de valores altos y quizás descartar los caballos malos productores de suero.

Acontece con esta antitoxina lo que con la tetánica y diftérica que por elección de los mejores animales se obtienen sueros muy activos. Además el protocolo permite apreciar la regularidad de los resultados del método propuesto.

PROT O C O L O

Fraciones de cm.³ mezcladas con 10 D. M. M. de toxina IV

Suero	Sangría de fecha	.1/15	.1/20	.1/25	.1/30	.1/35	.1/40	.1/50	.1/60	.1/70	.1/85	.1/100	.1/120	.1/150
525	25 - VII - 28	—	—	—	—	—		0		0	—	0	+	+
525	1 - IX - 27	—			0	—		+						
516	25 - VII - 28							0		0	—	0	0	+
516	1 - IX - 27							0		+				
522	25 - VII - 28				0	—		+		0	+	+		
522	1 - IX - 27					—		+						
449	25 - VII - 28				0	—		+		0	+	+		
449	1 - IX - 27					—		+						
359	25 - VII - 28		0	+	—	+		+		0				
359	1 - IX - 27					0		+						
375	25 - VII - 28			0		+		+						
375	1 - IV - 27					0		+						
519	25 - VII - 28							0		0	+	+	0	
867	" " "							0		0		0		
657	" " "							0	+	+				
660	" " "					0	0	+						
675	" " "					0	0	+						
806	" " "					0	0	+						
807	" " "			0		+		+						
809	" " "			0		+		+						

f). Bull y Pritchett (ver trabajo anterior), han hallado que para las mezclas de toxinas de *B. Welchii* y su antitoxina es válida la ley de los múltiplos.

Varios ensayos realizados nos han permitido corroborar esa afirmación.

Con los protocolos de págs. 548 y 550 de la comunicación anterior, puede deducirse que existe la ley de los múltiplos, por duplicación de las dosis de toxina para el caso de los sueros 809 y 359.

Es conveniente tener presente, que como el único signo de la intoxicación de las cobayas en estos casos es la muerte, una mezcla se revelará tóxica cuando quede por lo menos una D. M. M. libre. Como neutras aparecerán aquellas que no producen la muerte, por no existir una D. M. M. libre. Si suponemos que los intervalos de la dosis de suero son suficientemente pequeños, podemos imaginar que una mezcla, será la mezcla tóxica límite y otra la mezcla atóxica límite. La primera contendrá 1 D. M. M. libre y la segunda contendrá como límite máximo esa cantidad. Al juzgar de la aplicabilidad de la ley de los múltiplos será conveniente considerar esta realidad, pues una mayor cantidad de una mezcla que contiene toxina libre será más tóxica que una menor.

g) La probabilidad de determinar la actividad del suero anti-*perfringens* por la neutralización de la hemotoxina contenida en los filtrados ya fué demostrada por Henry y Weinberg. Recientemente Dalling, Glenny, Mason y O'Brien comunicaron haber hallado que las mezclas neutras para ratón blanco no tienen hemotoxinas libres, es decir, que son también neutras para los glóbulos rojos.

Como las toxinas usadas para la determinación del valor del suero no tienen practicamente valor hemolítico para glóbulos de oveja, cobaya o conejo, decidimos ensayar el filtrado de un cultivo de 12 horas, que contiene una hemotoxina activa. La dosis hemolítica es de 0.01 de cm.³. Se han empleado 50 y 100 dosis hemolíticas para glóbulos de conejo, lavados. Los sueros usados fueron los mismos cuyos títulos figuran en la pág. 560. Las mezclas fueron calentadas por 30' a 37° y luego se agregó a cada tubo 1 cm.³ de glóbulos al 5 %. La observación de la hemolisis fué hecha a la media hora de incubación a 37°. Para algunos sueros los resultados concordaron con los hallados por el método de medición indicado anterior-

mente. Para otros en cambio la actividad fué tan grande que el título era 10 veces superior al hallado por el mismo método. Las anomalías fueron tales que el método no pudo ser usado de ninguna manera para apreciar el valor antitóxico de los sueros.

Suero	Valor de neutralización de 1 dosis test de toxina (fracciones de cm. ³)	Valor de neutralización de 100 dosis hemolíticas (fracción de cm. ³)
807	1/30	1/250
675	1/45	1/200
809	1/30	1/250
806	1/45	1/200
660	1/45	1/250
657	1/55	1/250
375	1/30	1/300
359	1/15	1/150
522	1/85	1/200
449	1/85	1/300
519	1/85	1/200
867	1/120	1/400
525	1/120	1/400
902	1/120	1/800
516	1/200	1/1200