

Medición del suero anti-*histolyticus*

Por A. Sordelli y J. Ferrari

(SEGUNDA COMUNICACION)

Para la titulación de la actividad del suero antihistolítico fué propuesto por Wejnberg el empleo del conejo y como vía de inoculación la venosa. Este método utilizado desde hace 6 años en el Instituto Bacteriológico, dió resultados suficientemente claros para poder juzgar aproximadamente de la actividad de los sueros. Sin embargo, había que contar con una variación de actividad entre 1 y 4 para las mezclas de varios sueros. Esta diferencia es sólo imputable al empleo de toxinas diferentes en cada determinación y a la falta de un suero patrón para establecer la comparación.

En esta comunicación nos ocupamos del problema de la titulación del suero histolítico y proponemos el empleo de un método que permite la reproducción exacta de la determinación del valor antitóxico.

I

PREPARACION DE LA TOXINA

Se realizaron experiencias semejantes a las comunicadas ya para el *B. Welchii*, comparando la actividad de los filtrados de cultivos en caldo y en caldo con carne cocida. Pudo observarse

que a las 24 horas de incubación la toxina obtenida en el medio con carne es de 30 % hasta 300 % más activa que la preparada con el caldo común.

La adición de gelatina al caldo básico equivale a la adición de carne. La toxicidad de los líquidos centrifugados es muy grande, pues ya 0.03 cm.³ alcanzan a matar un conejo de 1000 gramos, inoculado por vía venosa. La toxicidad a las 12 horas es bastante elevada y aumenta hasta las 24 horas. A las 48 horas se atenúan las toxinas muy apreciablemente.

Para la preparación de la toxina aconsejamos el uso del mismo caldo con carne utilizado para la obtención de la toxina de *B. Welchii*. El caldo con gelatina es equivalente y se prepara agregando 6 % de gelatina al caldo básico. Después de esterilizado se toma una porción para ser titulada con Na OH y al volumen total del caldo se le agrega la cantidad calculada para llevarlo a pH 7.8. En este caldo recién enfriado se siembra un cultivo de *B. histolyticus* en agar blando incubando por 24 horas a 37°.

El cultivo se filtra por papilla de papel y después por bujía Berkefeld, con lo que la toxicidad se reduce, por lo menos a la mitad y a veces a un tercio. La dosis mortal mínima para el conejo de 1 kg. es de 0.20 cm.³

A este filtrado se agrega sulfato de amonio hasta la saturación y el precipitado se recoge y se seca en vacío sulfúrico. Luego se pulveriza, tamiza y conserva en vacío con P₂O₅, en frío y al abrigo de la luz.

II

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

La D. M. M. para el conejo de 100 gr. inoculado por vía venosa está comprendida entre 1 mgs. y 0.8 mgs. La muerte de los animales sobreviene en pocas horas.

En cuatro meses esta toxina conservada en la forma indicada no ha variado su toxicidad.

La investigación de la sensibilidad de distintas especies (cobayas, ratones blancos y conejos) inoculados por distintas vías nos condujo a considerar al conejo como la especie más regularmente sensible.

La sensibilidad relativa de las tres especies por vía venosa está dada por los siguientes valores de la D. M. M.: conejo (1000 grs.) 1.1 mgs.; cobaya (300 grs.) 1.1 mgs; ratón blanco (20 grs.) 0.13 mgs.

La regularidad de comportamiento del conejo de 1000 grs. (inyectado por vía venosa) puede apreciarse por el siguiente cuadro:

1.2 mgs.....	mueren	4
1.1 »	»	4
1.0 »	»	3 viven 2
0.8 »	»	0 viven 3

III

LA NEUTRALIZACIÓN DE LA TOXINA POR EL SUERO ANTITÓXICO

Las primeras tentativas hechas con 10 D. M. M. de toxina, dieron resultados tan irregulares que nos vimos precisados a reducir la dosis a 5 dosis mortales mínimas, con lo que conseguimos una regularización suficiente. De la investigación de la toxicidad de una misma mezcla para el conejo por vía venosa y para la cobaya por igual vía, resultó que esta última especie se comporta irregularmente y sólo proseguimos el estudio para averiguar si las mezclas eran igualmente neutras o tóxicas para ambas especies.

En general puede decirse que usando el mismo número de D. M. M. (5) para conejo y cobaya, las mismas mezclas son igualmente tóxicas o igualmente neutras. Hubiera sido conveniente estudiar si este fenómeno se observa por inoculación por vía muscular o peritoneal, pero la irregularidad del comporta-

miento de los animales inyectados por estas vías nos hizo abandonar el propósito.

Queda por lo menos probado que la neutralización de la toxina de *B. histolyticus* por el suero específico es un fenómeno idéntico para las dos especies mencionadas.

Pudimos asimismo demostrar que para ambas especies la ley de los múltiplos no tiene aplicación, bastando ya un aumento del 20 % de la dosis de la toxina para que la antitoxina deba aumentarse en proporción superior al 40 %, para conseguir los mismos resultados.

Una comparación de la actividad de un mismo suero para neutralizar dos, cinco y diez D. M. M. (conejos de 1000 gs. por vía endovenosa) reveló para el suero valores proporcionales a 8, 5.5 y 2.8 respectivamente.

IV

EL MÉTODO DE MEDIDA

Las determinaciones preliminares fueron realizadas con una toxina y un suero desecados en vacío. El suero fué disuelto en solución fisiológica con glicerina en la forma habitual. La toxina fué pesada y disuelta en solución fisiológica tomando como dosis test la cantidad equivalente a 5 D. M. M. La cantidad de suero que se eligió como dosis test fué la menor que no neutralizaba a la toxina. Fijada esta dosis se determinó la toxina test nuevamente en un número relativamente grande de ensayos.

La cantidad de suero usado es de 0.008 mg. El volumen de la mezcla es de 2 cm.³ y el tiempo de contacto a temperatura ambiente de 1/2 hora. Al cabo de este tiempo se inyecta al conejo por vía venosa.

TOXINA I

Dosis de suero	Dosis de toxina	Resultado
0.0008	0.0052	+
0.0008	0.0052	+
0.0008	0.0050	+
0.0008	0.0050	+
0.0008	0.0048	θ
0.0008	0.0048	θ
0.0008	0.0047	θ
0.0008	0.0047	θ

Se elije como dosis test la de 0.005 que es un poco inferior a la utilizada para la determinación de la dosis test de suero (0.0055). Esta diferencia es explicable si se tiene en cuenta que en este caso los intervalos entre las dosis de suero eran mucho mayores que los que hay entre las dosis de toxina en este experimento.

Se mide una nueva toxina y se obtiene como dosis test un valor de 2 mg. La sensibilidad del método es bastante grande y permite a juzgar por el protocolo anterior una aproximación del 4 %.

Con esas dos toxinas test obtenidas en épocas diferentes con caldo de carne la primera y con caldo de gelatina la segunda, se comparan tres sueros, uno de los cuales concentrado.

Los resultados están consignados en el protocolo siguiente; como tiempo de observación bastan 48 horas.

Medición comparativa de sueros histolíticos. Sangrías 25-7-27 y suero concentrado 883 con toxina I (dosis test. 0.005) y toxina II (Dosis test. 0.002)

12-9-28

Tox. hist. I Dosis test = 0.005			Tox. hist. II Dosis test. = 0.002		
Dosis		Resultado	Dosis		Resultado
Suero 456	1/150	880-850 gr. $\theta\theta$	Suero 456	1/150	764-900 gr. $\theta\theta$
	1/175	703-850 „ $\theta\theta$		1/775	758-1000 „ $\theta\theta$
	1/200	769-1000 „ $\theta\theta$		1/200	797-1000 „ $\theta\theta$
	1/230	790-1000 „ $\theta+14$		1/230	745-1000 „ $\theta+14$
Suero 656	1/450	794-900 „ $\theta\theta$	Suero 656	1/450	752-1000 „ $\theta\theta$
	1/500	702-950 „ $\theta\theta$		1/500	767-950 „ $\theta\theta$
	1/550	708-1000 „ $\theta\theta$		1/550	716-1000 „ $\theta\theta$
	1/600	728-1000 „ $\theta+14$		1/600	747-1000 „ $\theta+14$
Suero 883	Conc.		Suero Conc. 883	1/1000	715-1000 „ $\theta\theta$
	1/1000	783-1000 „ $\theta\theta$		1/1200	709-950 „ $\theta\theta$
	1/2000	727-950 „ $\theta\theta$		1/1400	741-1000 „ $\theta\theta$
	1/1400	725-950 „ $\theta\theta$		1/1600	738-1000 „ $+13$
	1/1600	705-1000 „ $+13$			

½ hora de contacto a temp. ambiente.
+ Toxina. Completado a 2 cm.³

½ hora de contacto a temp. ambiente.
+ Toxina. Completado a 2 cm.³

El protocolo revela una coincidencia total de las determinaciones con ambas toxinas. Aunque no se ha procurado una aproximación muy grande, la exactitud que permite alcanzar el método es suficiente para las necesidades de la práctica.

V

Para terminar comunicamos los resultados de la medición de los sueros de caballos inmunizados con toxinas medianamente activas (D. M. M.=0.20 cm.³). Los valores de los diferentes sueros acusan diferencias apreciables, lo que sin duda permitirá seleccionar los mejores productos y descartar los malos.

Sangría de prueba del 25 - VII - 1928

Caballo	Volumen de suero usado, en fracción de cm. ³								
	1/200	1/230	1/300	1/400	1/500	1/600	1/700	1/800	1/1000
636	0	—	0	0	0	—	0	0	+
456	0	+							
663	0	—	0	0	0	+	+		
656	0	—	0	0	0	+			
811	0	—	0	0	0	+			
658	0	—	0	0	0	—	0	+	+
932	0	—	0	0	0	—	0	0	+

RESUMEN

En el medio de De Kruif, Adams e Ireland el *B. histolyticus* segrega una toxina mucho más activa que en el caldo sin carne. Los mismos resultados se obtienen agregando en lugar de carne, 6 % de gelatina.

La toxicidad de los líquidos filtrados por papel es tal que un vigésimo de cm.³ mata al conejo por vía venosa. La filtración por bujía Berkefeld disminuye la toxicidad al 1/4.

La toxina es precipitada por el sulfato de amonio a saturación. Esta toxina conservada seca y en vacío no modifica su toxicidad en cuatro meses.

El animal de elección para estos ensayos es el conejo inyectado por vía venosa. La cobaya da resultados menos regulares y menos regulares aún el ratón blanco. Las vías muscular o peritoneal son mucho menos sensibles.

Con esta toxina hemos determinado el valor antitóxico de los sueros anti-histolíticos, empleando como dosis test 5 D. M. M. Esta dosis es suficiente para conseguir una aproximación del 4 % en la determinación de la dosis test del suero o de una dosis test de una nueva toxina.

Para determinar el valor de una toxina o de un suero se mezclan suero y toxina, se completan a 2 cm.³ con sol. fisiológica y después de ½ hora de contacto se inyecta un conejo de 1000 gramos por vía venosa.

La dosis test del primer suero que hemos empleado es de 0.8 mgs.; la dosis test de la primera toxina es de 5 mg. (D. M. M.). Una segunda toxina ha dado un valor de 2 mg. para la dosis test.

Las mezclas de toxina y antitoxina son igualmente neutras o tóxicas para el conejo o la cobaya inyectada por vía venosa. La elección del conejo ha sido determinada por la más gran regularidad de su comportamiento y por la mayor facilidad de la inyección por vía venosa.

Entre la toxina histolítica y su antitoxina, no existe relación de los múltiplos, es decir, que el valor de neutralización de un suero depende de la cantidad de toxina inyectada. Si se aumenta la cantidad de toxina al doble la actividad del suero se reduce casi a la mitad. Es por esta razón que debe tomarse buen cuidado de inyectar la cantidad total de la mezcla de toxina - antitoxina para no falsear los resultados.

Con dos toxinas preparadas con cuatro meses de intervalo y que tenían como dosis test 5 y 2 mgs., se han titulado dos sueros nativos y un suero concentrado. Los resultados han sido idénticos.

Se ha podido establecer que los caballos inmunizados producen suero de valor antitóxico muy diferente. El suero menos activo neutraliza la dosis test con 1/230 de cm.³ y el mas activo con 1/1000 de cm.³. El valor medio del suero de siete caballos fué de 1/700 de cm.³.