

Medición del suero anti-*œdematiens*

Por A. Sordelli, J. Ferrari y E. Mayer

(CUARTA COMUNICACIÓN)

El problema de la determinación del valor antitóxico del suero anti-*œdematiens* no ofrece ninguna dificultad, siendo comparable al caso de los sueros diftérico o tetánico, pues la toxina, que es muy activa y actúa después de un período de incubación, tiene los caracteres de una verdadera exotoxina.

Weinberg y Seguin (La gangrène gazeuse 1918, pág. 348) han probado que el valor antitóxico del suero puede ser determinado por neutralización de la toxina, usando como animal de prueba la cobaya o el ratón blanco.

Nuestros experimentos nos condujeron rápidamente a resultados satisfactorios, como era fácil de prever, pudiendo fijar las bases para el método de medición dentro de las líneas ya dadas por Weinberg.

I.

PREPARACIÓN DE LA TOXINA DE *B. œdematiens*

La obtención regular de una toxina de *B. œdematiens* no es un problema sencillo, pues aparte de la variación que imprimen a cada lote de toxina la naturaleza del caldo de cultivo, pierden a veces las cepas, bruscamente toda capacidad toxigénica. Este hecho que es en menor escala conocido para todas las especies toxigénicas es muy frecuente en el caso de *B. œdematiens*.

Basta recordar que un germen aislado por Novy y que se supone ser el *B. œdematiens* no pudo ser identificado con éste por la pérdida total del poder patógeno.

El caldo usado para la preparación de la toxina es el descrito en la primera comunicación y conocido como caldo básico.

Los filtrados tóxicos tienen una D. M. M. media de 0.005 de cm.³ para la cobaya inoculada por vía muscular.

Los resultados favorables para preparar las toxinas de *B. Welchii* y *B. histolyticus* obtenidos con el caldo adicionado de gelatina o de carne nos indujeron a repetir iguales ensayos con el *B. oedematiens*, pudiendo comprobar que la adición de 5 % de gelatina favorece considerablemente la formación de toxina. Los filtrados de los cultivos en caldo con carne son menos activos.

Protocolo (1)

Caldo básico pH 8.4 adicionado de 5 % de gelatina o de dos partes de carne cocida y extraída, por cada tres de caldo. Esterilizado a 100° durante una hora y a 110° - 15'. Alcalinizado hasta pH 8.4 después de la esterilización y sembrado con un cultivo de 24 horas en agar al 0.3 % (agar blando). Se incuba a 37°. La toxina se mide en cobayas de 250 grs. por inoculación intramuscular.

	Dosis	Resultado
Caldo común	0.005	O
	0.01	O
6 días de incubación	0.005	O
	0.01	O
Caldo carne	0.005	ed. no muere
	0.01	ed. no muere
6 días de incubación	0.005	ed. no muere
	0.01	ed. no muere
Caldo gelatina (1)	0.005	O
	0.01	O
6 días de incubación	0.005	ed. + 5 días
	0.01	ed. + 3 días

(1) Este caldo no puede ser empleado para preparar toxina test porque la gelatina que precipita con el sulfato de amonio aumenta la cantidad de precipitado enormemente.

Algunas experiencias realizadas después nos condujeron a adoptar como tiempo óptimo de incubación el de 6 - 8 días a 37°.

Esta toxina líquida se atenúa a veces con gran rapidez y no puede por esta razón ser usada como toxina test.

Por esta causa decidimos el empleo de una toxina precipitada (de caldo sin gelatina) a pesar de la pérdida enorme de toxicidad que implica la precipitación como puede apreciarse por el protocolo siguiente.

Protocolo (2)

2000 cm.³ de toxina filtrada por bujía Berkefeld, cuya D. M. M. es 0.005 cm.³ para la cobaya; se precipita con sulfato de amonio puro a saturación. Se obtienen 16.9 grs. de polvo seco cuya D. M. M. es de 0.00035. El líquido saturado con sulfato de amonio es atóxico.

Nº de D. M. M. en la toxina líquida	Nº de D. M. M. en la tox. precipitada
$2000 \times \frac{1}{0.005} = 400.000$	$16.9 \times \frac{1}{0.00035} = 42.000$

Esta toxina al fin de 45 días que fué conservada en secador sobre ácido sulfúrico no ha variado su toxicidad. Puede pues, considerársela suficientemente estable para ser utilizada como toxina test.

II

IDENTIDAD ENTRE EL PODER NEUTRALIZANTE DEL CULTIVO TOTAL, TOXINA FILTRADA POR BUJÍA Y TOXINA PRECIPITADA.

Si bien es cierto que las alteraciones patológicas que produce el *B. œdematiens* deben ser atribuidas solo a su toxina, hemos averiguado si el valor de neutralización de un suero era igual para una toxina libre de gérmenes o para el cultivo total. Además, el hecho mencionado más arriba de la pérdida considerable de la toxicidad por precipitación con sulfato de amonio nos hizo suponer que la pérdida de toxicidad estaría compen-

sada en algún grado por la transformación de la toxina en sustancias atóxicas pero capaces de fijar la antitoxina y que una D. M. M. de toxina líquida sería neutralizada por una cantidad menor de suero que una D. M. M. de la toxina precipitada. Los protocolos que siguen prueban que tanto el poder neutralizante de 1 D. M. M. del cultivo total como el de 1 D. M. M. del filtrado o de la toxina precipitada tiene igual capacidad de neutralización frente a un suero antitóxico.

Medición del cultivo total, 184 P. D. (1); 7 días incub.

1 - III - 28

		Dosis	Completado a 2 cm. ³ con sol. fisiol.	Resultado
Cobaya	582-210	0.002		
	590-220	0.004		" " " "
	586-240	0.006		" " " "
	592-210	0.008		" " " "
	567-230	0.010		" " " "
	578-220	0.013		ed ed ed + 5
	570-240	0.016		ed ed ed + 5
	568-210	0.019		+ 3

Med. del suero g 29 utilizando 40 D. M. M. de cultivo total 184 P. D.; 7 días incub.

1 - III - 28

		Dosis	Completado a 2 cm. ³ c. s. f.	Resultado
Cobaya	561 - 210 g 0.4 cultivo total + 0.008 suero	0.008		
	814 - 220 " " " " " 0.007 "	0.007		ed ped ped ped
	566 - 240 " " " " " 0.006 "	0.006		ed ed ed ed
	597 - 210 " " " " " 0.005 "	0.005		ed + 3
	809 - 220 " " " " " 0.004 "	0.004		ed + 3
	803 - 230 " " " " " 0.003 "	0.003		ed + 2

Suero g. 29 neutraliza por cm.³ 6660 D. M. M. de cultivo total.

(1) 184 P. D. es la designación de la cepa de *B. œdematiens* usada.

Medición del filtrado por Berkefeld 184 P. D.; 7 días incub.

1 - III - 28

		Dosis	Completado a 2 cm. ³ sol. fisiol.	Resultado
Cobaya	589 - 220 gr.	0.002		
	576 - 210 „	0.004		ed. ed. ed. ed.
	571 - 240 „	0.006		ed. ed. ed. ed.
	580 - 190 „	0.008		ed. ed. ed. ed.
	581 - 210 „	0.010		ed. ed. ed. ed.
	588 - 220 „	0.013		ed. ed. ed. ed. + 6
	591 - 240 „	0.016		ed. + 3
	573 - 230 „	0.019		ed. + 3

Medición del suero g 29 utilizando 28 ½ D. M. M. de toxina filtrada por Berkefeld de 184 P. D.; 7 días de incub.

1 - III - 28

		Dosis	Resultado
Cobaya	599 - 210	0.4 tox. + 0.014 suero	O O O O
	572 - 210 „	„ „ „ 0.012 „	O O O O
	594 - 230 „	„ „ „ 0.010 „	O O O O
	577 - 210 „	„ „ „ 0.008 „	O O O O
	998 - 220 „	„ „ „ 0.007 „	p. ed. p. ed. p. ed. p. ed.
	585 - 240 „	„ „ „ 0.006 „	p. ed. p. ed. p. ed. p. ed.
	596 - 210 „	„ „ „ 0.005 „	p. ed. p. ed. p. ed. p. ed.
	808 - 220 „	„ „ „ 0.004 „	ed. ed. ed. ed.
	587 - 230 „	„ „ „ 0.003 „	ed. ed. +

Suero g. 29 neutraliza por cm. 7100 D. M. M. de toxina filtrada por Berkefeld.

Medición de toxina filtrada por Berkefeld y precipitada por sulfato de amonio
184 P. D.; 7 días de incubación.

8 - III - 28

		Dosis	Completado a 2 cm. ³ sol. fisiol.	Resultado
Cobaya	869 - 220	gr. 0.00035		
	871 - 220	„ 0.00040		ed. ed. ed. ed.
	874 - 200	„ 0.00045		ed. ed. ed. + 12
	703 - 195	„ 0.00050		ed. ed. + 11
	837 - 210	„ 0.00055		ed. + 10
	702 - 195	„ 0.00060		ed. + 10

Medición de suero g 29 utilizando 40 D. M. M. de toxina filtrada por Berkefeld
y precipitada por sulfato de amonio.

8 - III - 28

		Dosis	Resultado
Cobaya	730 - 200	0.018 tox. + 0.014 suero	O O O O
	720 - 205	„ „ „ 0.012 „	O O O O
	728 - 190	„ „ „ 0.01 „	ed. ed. p. ed. p. ed.
	749 - 200	„ „ „ 0.008 „	ed. ed. ed. ed.
	726 - 200	„ „ „ 0.007 „	ed. ed. ed. ed.
	740 - 210	„ „ „ 0.006 „	ed. ed. ed. ed.
	735 - 195	„ „ „ 0.005 „	ed. + 9
	807 - 200	„ „ „ 0.004 „	ed. + 10
	713 - 215	„ „ „ 0.003 „	ed. + 9

Suero g. 29 neutraliza por cm.³ 6600 D. M. M. de toxina filtrada por Berkefeld y precipitada por sulfato de amonio.

III

EL MÉTODO DE DETERMINACIÓN

Una vez que hubimos probado que con la toxina de *B. œdematiens* y su suero se verifica la ley de los múltiplos entre límites bastante amplios, como es conocido y aceptado general-

mente, decidimos el uso de un número relativamente grande de D. M. M. para disminuir las causas de error y suficientemente pequeño para reducir en lo posible el gasto de toxina.

La D. M. M. de la toxina conservada por seis meses en vacío seco ha sido de 0.0004 mgs. La dosis test se fijó en 50 D. M. M., es decir, en 0.02 grs.

El suero test se preparó de la manera habitual y se conservó en vacío seco. La solución fué hecha de modo que cada cm.³ de la mezcla de glicerina y sol. fisiológica contuviera 2 mgs. de suero seco (suero 672).

La determinación de la dosis límite de suero que neutraliza la acción de la toxina dió el valor de 0.00027. Este valor fué elegido por error, pues debió haberse adoptado la dosis límite que no neutraliza, pero habiendo adoptado la dosis de 0.00027 de suero 672 como dosis test todo el sistema de medición queda basado sobre esa cifra. Basta modificar la dosis test de toxina de acuerdo con la medición siguiente.

Dosis de suero 672	Dosis de toxina I	Resultado
0.00027	0.016	p. ed.
"	0.018	ed.
"	0.020	ed. no muere.
"	0.022	ed. no muere.
"	0.024	ed. + 4 días.
"	0.026	ed. + 3 días.
"	0.028	ed. + 3 días.

La dosis test de toxina corresponde pues a 0.024 grs.

El método de medida queda pues basado en la elección de la cobaya inoculada por vía subcutánea y en la adopción de la dosis de 0.00027 grs. del suero test 672 como dosis test. La dosis test de la toxina I es de 0.024 grs.

La mezcla de suero y toxina se completa al volumen de 2 cm.³ y permanece antes de inyectar media hora a temperatura de laboratorio,

Con este método se han determinado los valores de los sueros de los caballos en inmunización. Los resultados están en el protocolo siguiente:

Suero	Dosis que neutr. 1 dosis test en cm. ³	Dosis que no neutr. 1 dosis test en cm. ³
879	0.0006	0.0005
874	0.0008	0.0007
672	0.0013	0.0010
495	0.0006	0.0005
491	0.0013	0.0010
378	0.0013	0.0010

Considerando las cantidades que no alcanzan a neutralizar una dosis test de toxina como equivalentes a la dosis test de suero, el valor medio de esas cifras es de 1/1300 cm.³ como el valor medio de los sueros anti-*œdematiens*.

RESUMEN

La preparación de una toxina test de *B. œdematiens* es fácil si se recurre a la precipitación por el sulfato de amonio de un filtrado tóxico.

Como caldo se usa el caldo descrito para la preparación de la toxina de *B. Welchii* (caldo básico). En este caldo a 37° el *B. œdematiens* produce el máximo de toxina a los 6 días. La adición de sulfato de amonio permite obtener aproximadamente 1/10 parte de la toxina disuelta. El resto se destruye, pues el líquido es completamente atóxico.

La toxina precipitada y desecada, conservada en el vacío seco no pierde su toxicidad en largo tiempo, siendo en consecuencia utilizable como toxina test.

El suero anti-*œdematiens* neutraliza el cultivo entero en igual forma que la toxina privada de gérmenes o esta misma to-

xina precipitada. Una dosis mortal mínima de cultivo, o de toxina líquida, o de toxina precipitada requiere la misma cantidad de suero para su neutralización. Parece que la toxina al ser precipitada no sólo pierde la toxicidad, sinó también su poder de fijación.

Las mezclas de toxina y suero que inoculadas por vía subcutánea a la cobaya son neutras, se comportan igualmente sea cual fuese la cantidad absoluta inoculada. Este hecho permite la elección de una dosis test de toxina que contenga un número relativamente grande de dosis mortales mínimas, con lo que se reduce la probabilidad de error.

Decidimos usar aproximadamente 50 dosis mortales mínimas de toxina, y fijar primeramente la dosis de suero que no es capaz de neutralizar esa cantidad de toxina y con esa cantidad de suero ya fijada determinar la dosis test de la toxina para la medición de los sueros.

El método que proponemos es el siguiente:

Toxina test. Obtenida por precipitación con sulfato de amonio a saturación conservada en vacío seco. *Suero test* conservado en igual forma y disuelto en solución fisiológica con glicerina. Como *animal de prueba* la cobaya inoculada por vía subcutánea con la mezcla de toxina antitoxina que ha permanecido por media hora a temperatura ambiente. El volumen inyectado es de 2 cm.³ Fijada la dosis test de toxina en 50 D. M. M. se determinó aproximadamente la mayor dosis de suero que da una mezcla tóxica (tiempo de observación 4 días). Esta dosis de suero es la que se considera base para toda medición ulterior.

Dosis test de toxina. Se determina mezclando con la dosis test de suero dosis variable de toxina e inoculando las mezclas a la cobaya. La dosis menor de toxina que ha dado una mezcla tóxica es la que se usa como dosis test.

La determinación del valor de un suero se hace de acuerdo con la técnica corrientemente usada para los sueros antitóxicos. El valor medio de los sueros inmunes es tal que en 1/1300 de cm.³ está contenida la dosis test.