

## Medición del suero anti-vibrión séptico

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

(QUINTA COMUNICACIÓN)

Ida Bengston <sup>(1)</sup> describe someramente un método que designa con el nombre de método francés, que consiste en determinar la dosis de neutralización del suero, mezclado con una toxina líquida e inoculado por vía venosa a conejos de 1000 gramos.

Weinberg y Seguin <sup>(2)</sup> demuestran que es posible determinar el valor del suero por neutralización de la toxicidad o del poder infeccioso de un cultivo de *V. séptico*. Siguiendo sus indicaciones hemos utilizado desde el año 1921 la cobaya como animal de prueba para medir el valor anti-infeccioso del suero.

Recientemente Buttle y Trevan <sup>(3)</sup> comunican un método basado en la sensibilidad de órganos aislados, a la toxina de *V. séptico* y la neutralización de esa acción por el suero específico.

La titulación del suero consiste en mezclar a una dosis fija de toxina, dosis variables de suero (20 a 25 % de diferencia entre 2 dosis) y en determinar la mezcla que no produce acción sobre un útero aislado. Las mezclas neutras para el ratón blanco (vía venosa) son prácticamente neutras para el útero.

El método permite apreciar diferencias del 25 %, pues la dosis de suero que no neutraliza nada es de  $19 \times 10^{-5}$  cm.<sup>3</sup> y la que neutraliza totalmente es de  $31 \times 10^{-5}$ . Con una dosis interme-

---

(1) Hygienic Laboratory Bulletin N° 122, pág. 29.

(2) La gangrene gazeuse. Weinberg. 1918.

(3) The British Journal of Experimental Pathology. 1928, vol. IX, pág. 182.

dia de  $25 \times 10^{-5}$ , 4 ratones mueren entre 10 inyectados. Como método de aproximación pueden servir tanto el de la neutralización del poder tóxico en el ratón o el de la neutralización de la acción sobre el útero.

En la rutina de la determinación del valor del suero anti-vibrión séptico hemos empleado desde el año 1922 la neutralización de un cultivo entero de *V. séptico* en el caldo básico usado para los anaerobios (ver primera comunicación Sordelli, Jiménez de Asúa y Ferrari). La mezcla de cultivo y de suero era inyectada en la masa muscular de la pata de la cobaya (muslo). Los resultados eran irregulares y difíciles de reproducir y el valor de un suero era considerado bueno si  $0.001 \text{ cm.}^3$  neutralizaba una cantidad de cultivo seguramente mortal. Por regla general se usaban  $0.25 \text{ cm.}^3$  de un cultivo cuya dosis mortal mínima era un poco superior a  $0.10 \text{ cm.}^3$ . La variación brusca del poder patógeno, la necesidad de conservar la virulencia por pasaje y la inseguridad de poder obtener un resultado nos decidieron a buscar una técnica que reuniera las condiciones de exactitud y simplicidad que deben poseer los métodos de medida de los productos biológicos.

## I

### *Preparación de la toxina*

Los ensayos realizados con el caldo básico solo y adición de carne, revelaron que el poder patógeno del cultivo en caldo con carne es muy superior al cultivo en caldo solo.

PROTOCOLO

Dosis de cultivo	Caldo solo	Caldo con carne
0.02	0	+ 24 horas
0.05	0	+ 24 horas
0.10	0	+ 24 horas
0.20	0	0

La inyección se hace por vía intramuscular. El volumen inoculado es de  $2 \text{ cm.}^3$ . Aunque estos datos no permiten dedu-

cir que el cultivo más patógeno sea el más tóxico, nos indujeron a emplear el caldo con carne, que nos dió resultados favorables.

*Método de preparación de la toxina test de Vibrión séptico*

En un frasco de 6 litros se colocan 2 kilos de carne molida y cocida, 3 litros de caldo peptona P. & D. 2 % y 0.5 % de CINa. Se esteriliza una hora a vapor y 10' a 115°. Se enfría rápidamente y se alcaliniza hasta tinte ligeramente rosado a la fenoltaleína, tomando en cuenta solo el volumen del caldo empleado. Se agrega 60 cm.<sup>3</sup> de solución de glucosa al 10 % y se siembra con cultivo en agar blando de 48 horas. Después de 48 horas de incubación a 37° es filtrado por papilla de papel y por bujía Berkefeld, y se prueba su toxicidad por vía intramuscular e intravenosa en cobayas.

23 - IV - 28 Cobayas vía endovenosa	23 - IV - 28 Cobayas vía intramuscular
0.1 470 - 230 vive	0.2 452 - 240 gr. p.ed.p.e. 0 0
0.2 455 - 240 + en la noche	0.3 476 - 250 p.ed.p.ed 0 0
0.3 451 - 240 + en la noche	0.4 462 - 250 g.ed. + 25
0.4 433 - 260 + en la noche	0.5 465 - 240 + 24
0.5 466 - 240 + 12'	0.7 471 - 200 + 24

A 1600 cm.<sup>3</sup> de filtrado por papilla y Berkefeld se añade sulfato de amonio hasta saturación. Se recoge el precipitado y se seca. Se obtienen 16.5 grs. de polvo seco que se distribuye en dispositivos para su conservación en vacío seco.

## II

*Sensibilidad de las cobayas y ratones blancos a la toxina*

La toxina preparada por precipitación con sulfato de amonio se conserva en vacío seco y se usa para cada determinación una solución recién preparada en solución fisiológica.

La prueba de la toxicidad por vía venosa y vía muscular en cobayas de 200 grs. revela una mayor sensibilidad por la primera de las vías. En cuanto a la regularidad de la muerte ambas vías son comparables.

Dosis inoculadas grs.	Vía muscular		Vía venosa	
	Viven	Mueren	Viven	Mueren
0.002	4	0	3	0
0.0025	3	0	1	2
0.0030	1	5	0	3
0.0040	0	6	0	3
0.0050	0	1	0	1

La D. M. M. por vía venosa puede considerarse comprendida entre 2.5 y 3 mgs. y por vía muscular próxima a 3 mgs. Por vía peritoneal la D. M. M. está comprendida en 4.5 y 6 mgs.

Para el ratón blanco la D. M. M. por vía muscular es de 1.2 mgs. y por vía peritoneal próxima a 4 mgs. Por vía venosa los resultados fueron irregulares, posiblemente por causas ajenas a la intoxicación misma, pero no se prosiguió la investigación para dilucidarlas.

De las dos vías, venosa y muscular, se decidió elegir la muscular por ser más fácil la inoculación. Para el ratón blanco fué elegida la misma vía.

### III

La neutralización de la toxina del V. séptico por el suero específico no se rige por la ley de los múltiplos, siendo comparable a la neutralización de la toxina de *B. histolyticus* por su suero.

Los experimentos fueron hechos por inoculación intramuscular a las cobayas de la mezcla de toxina y antitoxina después de haber quedado 30' a temperatura ambiente. Los resultados son los siguientes:

La D. M. M. de toxina es de 3 mgs. Se inoculan cobayas con 2, 5 y 10 D. M. M., es decir, con 6, 15 y 30 mgs. de toxina y cantidades variables de suero.

Dosis de suero	Dosis de toxina	Resultados
0.00015	0.006	ed. +
0.00020	0.006	ed. +
0.00025	0.006	p. ed. 0
0.00030	0.006	0 0
0.0005	0.015	ed. +
0.0007	0.015	ed. +
0.001	0.015	ed. +
0.0013	0.015	p. ed. 0
0.0025	0.030	ed. +
0.0030	0.030	ed. +
0.0035	0.030	ed. +
0.0040	0.030	p. ed. 0

Si se considera que las mezclas neutras son las de 0.00025 cm.<sup>3</sup> de suero para 2 D. M. M. de 0.0013 para 5 y de 0.0040 para 10, cada cm.<sup>3</sup> de suero tiene un valor de neutralización proporcional a 8, a 3.8 y a 2.5, según se hayan usado 2, 5 o 10 D. M. M. para su medición. Esta propiedad impone la necesidad de inyectar totalmente la mezcla de suero con la dosis test de toxina, pues la más pequeña pérdida implicaría un aumento considerable del valor antitóxico del suero.

#### IV

Los ensayos de elección de la dosis test nos condujeron a adoptar la cantidad de 20 mgs. para la cobaya y de 6 mgs. para el ratón blanco. En realidad el pensamiento fué la elección de 5 D. M. M. de toxina para cada especie. Como probablemente la D. M. M. para la cobaya esté más próxima a 3 mgs. que a 4

mgs. hubiéramos debido usar 15 mgs. Esto solo tiene importancia si se quiere comparar la neutralidad o toxicidad de una mezcla para dos especies distintas, puesto que para el método en sí, 5 o 6 dosis mortales son prácticamente equivalentes.

De los dos protocolos que se transcriben a continuación se deduce que las mezclas tienen una toxicidad muy semejante para las dos especies. La dosis de suero que da con seguridad una mezcla tóxica es la de 0.7 mgs. de suero para 20 mgs. de toxina.

Esta dosis de suero es la que se fija como dosis test para todas las determinaciones ulteriores.

SUERO V. SÉPTICO 677

16 - VIII - 28

Mezcla I = 0.0018	suero + 0.060 tox.	Vol. total 3	cm. <sup>3</sup>	} ½ hora a temperatura ambiente
" II = 0.0021	" " " "	" " 3	cm. <sup>3</sup>	
" III = 0.0024	" " " "	" " 3	cm. <sup>3</sup>	
" IV = 0.0027	" " " "	" " 3	cm. <sup>3</sup>	
" V = 0.0030	" " " "	" " 3	cm. <sup>3</sup>	

*Inyección intramuscular en cobayas y lauchas. Cobayas 1 cm.<sup>3</sup>. Lauchas 0.30 cm.<sup>3</sup>*

Cobayas	Mezcla I	465 - 200	ed. + 18
	"	482 - 200	ed. + 18
	Mezcla II	414 - 200	ed. + 18
	"	434 - 240	ed. + 17
	Mezcla III	413 - 200	p. ed. + 19
	"	480 - 200	p. ed. 00
	Mezcla IV	494 - 190	p. ed. 00
	"	459 - 200	p. ed. 00
	Mezcla V	411 - 210	p. ed. 00
	Lauchas	Mezcla I	Cabeza roja
"		" "	+ 17
Mezcla II		Lomo rojo	ed. ed. + 20
"		" "	ed. ed.
Mezcla III		Cola roja	ed. 0
"		" "	ed. + 18
Mezcla IV		Panza roja	00
"		" "	00
Mezcla V		Pata d. roja	00
"		" " "	00

## SUERO V. SÉPTICO 677

20 - VIII - 28

Mezcla I = 0.0018	suero	+ 0.060 tox.	Vol. total	3 cm. <sup>3</sup>	} ½ hora a temperatura ambiente
" II = 0.0021	"	"	"	3 cm. <sup>3</sup>	
" III = 0.0024	"	"	"	3 cm. <sup>3</sup>	
" IV = 0.0027	"	"	"	3 cm. <sup>3</sup>	

*Inyección intramuscular en cobayas y lauchas. Cobayas 1 cm.<sup>3</sup>. Lauchas 0.30 cm.<sup>3</sup>*

Cobayas	Mezcla I	341 - 210	+ 21
	"	326 - 220	+ 21
	Mezcla II	304 - 190	+ 21
	"	363 - 200	+ 21
	Mezcla III	369 - 190	p. ed. + 22
	"	372 - 200	p. ed. 0
	Mezcla IV	246 - 190	p. ed. 0
	"	329 - 190	p. ed. 0
Lauchas	Mezcla I	Cabeza roja	+ 22
	"	" "	+ 21
	Mezcla II	Lomo rojo	ed. + 22
	"	" "	ed + 22
	Mezcla III	Cola roja	0 + 22
	"	" "	00
	Mezcla IV	Panza roja	00
	"	" "	00

*Titulación de la toxina test*

El suero test se disuelve en solución fisiológica glicerina-da de tal manera que cada cm.<sup>3</sup> contenga 10 mgs. de suero.

La dosis test de 0.7 mgs. se mezcla con dosis diferentes de toxina completando el volumen a 2 cm.<sup>3</sup>. La mezcla se inyecta a la cobaya por vía muscular después de media hora de permanencia a la temperatura de laboratorio. La observación de los animales dura dos días. La mezcla produce una reacción local que a veces se reabsorbe rápidamente. Las mezclas más tóxicas matan casi sin excepción dentro de los dos días. Los resultados no se modifican mucho si la observación se prolonga por 4 días.

A continuación se transcriben los protocolos de medición de dos toxinas test. La diferencia entre dos dosis ha sido elegida un poco alta, pues es probable que el método no permita con un solo animal una aproximación mayor.

La dosis test de la toxina I es de 0.022 grs. y la de la toxina II 0.018.

30 - VIII - 28

Suero 0.0007 + 0.016 toxina	I	916-230	0 0
0.016 "	"	914-220	p.ed. p.ed.
0.019 "	"	991-220	p.ed. p.ed.
0.019 "	"	976-230'	ed. ed.
0.022 "	"	918-240	p.ed. + 2
0.022 "	"	935-240	+ 1
0.025 "	"	953-230	+ 1
0.025 "	"	947-220	+ 1
0.028 "	"	967-230	+ 1
0.028 "	"	972-240	+ 1
Suero 0.0007 + 0.016 toxina	II	904-220	p.ed. p.ed.
0.016 "	"	928-230	" "
0.018 "	"	984-220	ed. + 2
0.018 "	"	942-240	ed. + 3
0.020 "	"	990-230	ed. + 2
0.020 "	"	939-220	ed. + 1
0.022 "	"	960-230	ed. + 1
0.022 "	"	958-230	ed. + 1

## VI

Con las dos toxinas tituladas se determina el valor antitóxico de dos sueros nativos y de un suero concentrado.

Las diferencias son de escasa monta y prácticamente pueden considerarse los valores obtenidos con las dos toxinas como idénticos.

La mezcla de la dosis test de toxina y cantidades distintas de suero se deja a t. ambiente por media hora. El volumen es de 2 cm.<sup>3</sup>.

		TOXINA I	
Suero 882	1/300	+ 0.022 tox.	963-220 ped ped ped ped
	1/325	„	956-230 ed + 5
	1/350	„	985-230 ed + 5
	1/375	„	907-230 ed + 5
Suero 862	1/300	„	913 220 ped ped ped ped
	1/325	„	950-220 ped ped ped ped
	1/350	„	921-220 ped ped ped ped
	1/375	„	937-230 ed ed ed ed
	1/400	„	924-230 ed + 6
Suero conc. 882	1/600	„	930-230 pe ped 0 0
	1/700	„	971-230 ped ped 0 0
	1/800	„	970-230 0 0 0 0
	1/900	„	917-230 ed + 5

## TOXINA II

Suero 659	1/300	+	0.0018 tox.	929-220	ed	ped	ped	ped
	1/325		„	997-220	ed	ed	ed	ed
	1/350		„	919-230	ed	+	7	
	1/375		„	910-220	ed	+	7	
Suero 862	1/300		„	965-220	ed	ped	ped	ped
	1/325		„	915-220	ed	ed	ped	ped
	1/350		„	923-230	ed	+	5	
	1/375		„	957-230	ed	ed	ed	ed
	1/400		„	920-220	ed	+	7	
Suero conc. 882	1/600		„	936-230	ed	ped	ped	ped
	1/700		„	968-230	ed	ed	ed	ed
	1/800		„	994-230	ed	ed	ed	ed
	1/900		„	912-230	ed	+	5	

## VII

Con el método descrito se ha investigado la actividad de los sueros de los caballos productores de sueros, hallando diferencias apreciables entre ellos. Los protocolos que siguen revelan al mismo tiempo que esa diferencia, la aplicabilidad del método. Cierto es que los intervalos entre dos dosis son bastante grandes, pero son los que la práctica aconseja.

*Fracciones de cm.<sup>3</sup> mezcladas a las dosis test.*

Caballo	1/150	1/200	1/300	1/350	1/400
659			0	+	+
632	0	+	+		
862			0	p. ed	+
513			0	0	ed
628			0	p. ed	+
499			0	+	+
677			0	+	+
676			0	+	+
853	0	+	+		
845		ed	+	+	

El valor medio de estos sueros es tal que 1/340 de cm.<sup>3</sup> corresponde a la dosis test de suero test.

## RESUMEN

El V. séptico produce una toxina regularmente activa si se emplea como medio de cultivo el caldo de De Kruif Adams e Ireland con dos partes de carne para tres de caldo. La filtración por bujía reduce la toxicidad de tal manera que la D. M. M. para la cobaya por vía venosa solo alcanza a 0.2 cm.<sup>3</sup>.

Esta toxina se atenúa si se la conserva al estado líquido siendo por lo tanto difícil usarla como toxina test. Precipitada con sulfato de amonio a saturación y conservada en vacío seco no disminuye su toxicidad en largo tiempo. La toxicidad se puede determinar fácilmente en cobayas o ratones por vía muscular o venosa. Las cobayas reaccionan de manera uniforme con cualquiera de las dos vías de inyección. La D. M. M. por vía venosa es próxima a 2.5 mgs.; por vía muscular un poco superior a 3 mgs. Por vía peritoneal la toxicidad es mucho menor. Igual acontece con los ratones blancos, aunque los resultados son menos regulares que con las cobayas.

La neutralización de la toxina por el suero fué probada en cobayas y ratones blancos inyectados por vía muscular. La misma mezcla de toxina y de suero fué inyectada en proporción de un número de D. M. M. (aproximadamente 5) observando que las mezclas son igualmente tóxicas o neutras para la cobaya o el ratón.

El comportamiento más regular de las cobayas hizo que se las prefiriera a los ratones para la técnica de la titulación del valor del suero.

Fijada provisionalmente la dosis test de toxina en 20 mgs. que corresponde a un poco más de 5 D. M. M., se tituló un suero test, y con la dosis test de este como base, fueron tituladas las toxinas test.

El método propuesto puede ser resumido en la siguiente forma: *Suero test* desecado rápidamente, pulverizado y conservado en vacío seco. Se elige como dosis test la mayor dosis que no neutraliza la dosis provisional de toxina test <sup>(1)</sup>. Toxina test precipitada por sulfato de amonio, desecada, pulverizada y conservada en vacío seco. Con la dosis test de suero se determina la toxina eligiendo como dosis test la menor dosis, que mezclada al suero, mata la cobaya en dos días.

*Animal de prueba:* cobaya de 250 grs. *Vía:* intramuscular. *Volumen de mezcla* 2 cm.<sup>3</sup>. Contacto 30' a temperatura ambiente.

Hay que tener buen cuidado en que no se pierda nada de la mezcla inyectada, pues la toxicidad depende en grado sumo de la cantidad absoluta de toxina inoculada. El método permite

---

(1) Se entiende que debe ser la dosis que mata la cobaya en dos días.

una aproximación del 15 %, usando un solo animal en cada prueba. Con dos toxinas test preparadas en tiempos diferentes tres sueros titulados paralelamente han dado iguales valores de neutralización.

Los caballos inmunizados producen sueros de valor diferente, variando la dosis que neutraliza la dosis test de 1/150 a 1/400 de cm.<sup>3</sup>.

El valor medio del suero de 10 caballos es tal que 1/340 de cm.<sup>3</sup> equivale a la dosis test de suero test.