615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

II. Preparación del suero antioedematis-maligni

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Soroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

Los trabajos iniciales sobre la toxina del *Clostridium oedematis-maligni* (vibrion septique), fueron realizados por Roux y Chamberland (13). Pero la propiedad del *Clostridium oedematis-maligni* (v. septique) de producir exotoxina genuina termolabil, fue señalada por primera vez en 1901 por Leclaincle y Morel (6) haciendo crecer este anaerobio durante 5 días en caldo Martin glucosado.

En 1915, Raphael y Frasey (12) prepararon su toxina de la manera siguiente: las muestras conservadas en caldo yema de huevo, eran repicadas en caldo Martin glucosado al 2 %; la cultura hija era pasada en caldo Martin no glucosado. La cultura neta obtenida servía para sembrar un balón de caldo glucosado al 2 %. Después de 24 horas de incubación, el caldo era centrifugado y filtrado en vela. El filtrado mataba regularmente el conejo de 2 kilos en la dosis de 0.5 c.c. a 1 c.c. La toxina así obtenida era muy inestable y se atenuaba rápidamente mismo man tenida en la heladera.

Nicolle, Césare y Raphael (8) usaron también el caldo Martin glucosado a 2 %. La cultura era también filtrada, pero sólo después de haber sido incubada al termostato durante 5 a 15 días. Las toxinas así obtenidas, eran muy atenuadas, tal vez debido a la incubación muy prolongada que causa un debilitamiento muy considerable de la toxina .

Weinberg y Seguin (20) incubando de 36 a 40 horas, obteniam mejores toxinas. Experimentaron numerosas medios habiéndoles proporcionado mejores resultados el caldo Martin glucosado a 0.5 o/oo, desejado envejecer varias semanas a la temparatura del laboratorio.

Según British Medical Research Committee (7) Miss Muriel Robertson, preparaba toxina vibrión séptico de título muy elevado, usando caldo simple o glucosado con pH 7.8 a 8.0 sembrado con fragmentos de hígado de cobayo muerto por infección a vibrión séptico.

Ficker (3) adicionando carbonato de calcio para neutralizar los ácidos formados, consiguió obtener toxinas muy fuertes, con D M L para la laucha 0.005 c.c.

Wuth (22) adicionando también carbonato de calcio al caldo glucosado, obtuvo el máximo de producción de toxina entre 9 a 11 días, pudiendo ya en 24 horas, demontrar la presencia de toxina. Este autor demostró que la toxina era destruída en 20 minutos a 70° C y que se atenuaba a la temperatura ambiente, siendo muy sensible a la acción de la luz y del aire.

Karube (4) hizo un estudio comparativo sobre los diferentes medios; los mejores resultados fueron obtenidos con medio V F y medio con carne de ternera, que da toxina mortal para la laucha en la dosis de 0.005 c.c.; con tenor elevado en glucosa aumentaba el poder tóxico de la toxina.

La adición de cisteina acelera la producción de la toxina y retarda su atenuación espontánea. El medio sin glucosa no produce toxina; después de 7 horas la toxina ya está presente, y con 16 a 20 horas llega a su concentración máxima; después de 48 horas comienza a atenuarse, desapareciendo enteramente al fin de 14 días. Las mejores peptonas fueron la Chapoteaut y Witte; ambas dan lugar a la producción de gran cantidad de hemolisina. Los medios de cultura con pH 7,6 ó 7,8, fueron los que producían cantidades mayores de toxina vibrión séptico.

Según Karube la toxina se conserva mejor con pH entre 5 y 6.0.

I. — Preparación de la toxina

Cepa

Según Robertson (14) existen por lo menos 3 tipos serológicos demostrables por la aglutinación. Tanto las muestras antiguas, como las muestras recientemente aisladas, cuando son toxigénicas, dan buenas toxinas.

Debe usarse una o varias muestras, buenas productoras de toxina. Los pasajes por cobayos pueden aumentar bastante el poder toxígeno. Para esto se inocula 0.5 c.c. de uma cultura en el músculo de la pierna y cuando el cobayo estuviere agonizante, se sacrifica y se retira un fragmento de hígado que se siembra directamente en los balones de cultivo o en tubos de Tarozzi con suero; los cultivos destinados a la producción de toxina deben ser siempre muy jóvenes, por esta razón conviene repicarlos frecuentemente.

Posemos en el Instituto Butantan 20 cepas para la preparación de suero anti oedematis-maligni (vibrión séptico).

Medios de cultivo

A). — Medical Research Committee (7) aconseja caldo simple o glucosado con pH 7,8 a 8,0.

B). — Walbum y Reymann (16) obtienen buenas toxinas con el siguiente medio:

1º — Caldo de ternera común conteniendo 1 % de peptona.

2º — Antes de autoclavar ajustar a pH 8.0 y distribuir en frascos de 1 litro a 1 litro y medio; después de esterilizado el pH se conserva a 7,6 — 7,8.

3º — Antes de sembrar agregar glucosa (solución a 50 %) a 1 % y 20 a 30 grs. de carbonato de calcio estéril.

4º — Expulsar el aire por calentamiento durante 2 horas, hirviendo en baño maría con agitación regular; adicionar 200 c.c. de parafina líquida estéril y continuar el calentamiento durante 30 minutos.

Los medios preparados con peptona Riedel, Proteosa-peptona Difco y peptona Martin dan buenas toxinas.

La estabilidad máxima de las toxinas fueron obtenidas a pH 6.5.

C.) — Weinberg, Nativelle, y Prevot (17) obtuvieron los mejores resultados con el conocido medio de V F.

D.) — Bengtson (2) usa caldo Martin y 2 % de suero de caballo estéril.

E.) — Nosotros aconsejamos el medio descripto a propósito de la preparación de sueros perfringens, glucosado a 1 %.

Condiciones que favorecen la producción de toxina

a) — La agitación una vez al día; la agitación excesiva oxida la toxina.
b) — La adición de cloruro de calcio que impide que el pH baje de 6,5.
c) — La adición de carne cocida, de suero normal de caballo y de hígado.
d) — La adición de cisteina.

Condiciones que atenuan la toxina

a) — La permanencia en la estufa, por más de 48 horas.
b) — La presencia de O en el medio por falta de calentamiento previo.
c) — La acción directa de la luz solar sobre el medio, aun antes de sembrado.

d) — La permanencia muy prolongada del medio de cultivo en la estufa o a la temperatura ambiente.
e) — El envejecimiento de la toxina, aun a baja temperatura.
f) — La acidez del medio. La toxina de *Clostridium oedematis-maligni* se conserva bien con pH 6,5.
g) — La filtración.
h) — El pasaje de burbujas de aire, de oxígeno o de hidrógeno.

Condiciones que no influyen en la produccion de toxina

La concentración de peptona.

Siembra

El medio, una vez retirado del autoclave es enfriado a 40° C. Será sembrado de preferencia con un fragmento de hígado de cobayo inoculado el día anterior con cultura bien virulenta de vibrión séptico y sacrificado en el momento de la siembra. Si hubiese necessidad de hacer repiques directos, las culturas deberán ser conservadas en medios de igual composición al caldo de toxina y los repiques serán repetidos cada 12 horas. Cada 1000 c.c. de medio será repicado con 20 c.c. de cultura joven.

Periodo de incubación

Las exigencias anaeróbicas del vibrión séptico le colocan entre el *Clostridium welchii* y el *Clostridium oedematiens*.

Obtiénese un crecimiento abundante en un medio recubierto con una capa de parafina líquida, 1 a 2 c.c. en la superficie. El máximo de producción de toxina es obtenida con 36 a 40 horas de incubación a 37° C.

Obtención de la toxina

Para los fines de inmunización la toxina debe ser centrifugada hasta la obtención de un líquido límpido.

La toxina del vibrión séptico no consigue siempre atravesar las velas Chamberland. Ciertas velas dejan pasar totalmente o casi totalmente. De aquí la necesidad de comenzar la inmunización con toxinas filtradas y terminar con toxinas centrifugadas. Usar los métodos nefelométricos a fin de precisar el grado de turbidez de la toxina y su consecuente riqueza en gérmenes.

Acción de la toxina

Produce un edema extenso de coloración rojo fuerte y una considerable cantidad de gas en deredor de los músculos y tejidos invalidos por el proceso de gangrena gaseosa.

Pasternack y Bengtson (10) verificaron que la toxina del vibrión séptico actuaba casi sin período de incubación, dependiendo la rapidez de su acción tóxica, exclusivamente de la dosis inoculada, al contrario de otras toxinas que necesitan, sea cual fuere la dosis inoculada, un cierto período de incubación para producir su acción tóxica. Además verificaron que un aumento insignificante en dosis no tóxicas es suficiente para tornarlas mortales.

"Lautenschlager, however, as the result of this experiments, reached the conclusion that the toxic dose for rabbits followed the "all or none", i. é, the smallest amount of toxin which was fatal reacted as quickly and potently as a considerably larger fatal dose. An amount slightly smaller than the minimal lethal dose had no effect".

Esta ley explica, porqué es a veces tan difícil determinar el test-dosis vibrión séptico y hacer el dosage del suero respectivo, una vez que se exige, por definición 50 % de muertes en el primer caso y 50 % de protección en los dosages de suero. Mínima cantidad de toxina residual no neutralizada es suficiente para producir 100 % de mortalidad.

Acción sobre el aparato circulatorio — La inoculación de toxina de vibrión séptico produce una rápida elevación y después un descenso brusco de la presión arterial acompañada de una arritmia cardíaca. El corazón es directamente atacado por la toxina, quedando esta acción sin efecto seccionando los neumogástricos. La acción de la toxina vibrión séptico es idéntica a la acción de la digital sobre el músculo cardíaco.

Acción sobre la sangre. — El poder hemolítico del vibrión séptico es muy pronunciado. La acción hemolítica se manifiesta sobre los glóbulos rojos del cobayo, conejo, carnero, caballo y humano. Los hematies del conejo y el cobayo son aglutinados por las toxinas del vibrión séptico. Según Walbum la estabilidad óptima de la hemolisina se obtiene con pH 5. 0.

Sintomatologia.

El período de incubación no existe o es muy corto, variando de algunos segundos a 60 minutos.

Despuées de la inoculación de la toxina vibrión séptico, las lauchas presentam una serie de movimientos violentos y convulsivos. Giran sobre sí mismo, hasta que sobreviene la muerte. La muerte no demora mucho en virtud de

la acción que ejerce la toxina vibrión séptico sobre el organismo del animal de experiencia como vimos más arriba.

Necropsia.

La toxina del vibrión séptico no produce lesiones características. En trabajos recientes Pasternack y Bengston (10) estudiaron la acción de la toxina del vibrión séptico sobre lauchas, cobayos, conejos y palomas.

En los músculos de cobayos inoculados, se observan intensa coloración roja; el hígado, y la cápsula suparenal presentan una coloración menos intensa, a veces hay ruptura de estómago.

En lauchas, animales usados por nosotros para dosages de toxina y suero, el corazón presenta la musculatura muy blanda; microscópicamente los capilares y vasos cardíacos están regularment llenos de sangre. Nótase hemorragias intersticiales de grado variables. Estas lesiones cardíacas son de tamaño y grado tambiém variables. En general estas variaciones dependen de la dosis y duración del processo tóxico. Areas proeminentes de degeneración hialina de Zenker pueden constatarse en los animales que sobrevivem más de 30 minutos. En algunos casos grandes extensiones de músculo cardíaco normal están presentes. En otras áreas, grupos de músculos y de fibras aparecen pálidos. En estas fibras las extriaciones trasversales están generalmente suprimidas. Los núcleos quedan normales. La necrosis hialina de Zenker es la degeneración paranquimatosa más común, siendo más frecuente en los ventrículos. No se encuentra regeneración del músculo cardíaco.

Los riñones se hallan igualmente afectados, aumentados de volumen e intensamente congestionados y rojos. Animales que sobreviven por algún tiempo, muestran hemorragias en el tejido capsular y perirenal. En riñón es irregularmente moscado por un puntillado hemorrágico intercalado por áreas amarillentas de necrosis. Este cuadro es más evidente cuando se secciona la cápsula. Seccionado el riñon se verifica el aumento de tamaño del cortex y los glomerulos como minúsculos puntos rojos en la palidez del cortex. En la conjunción del cortex con la médula se notan muchas veces una zona hemorrágica. La zona medular está intensamente congestionada y frecuentemente muestra pequeñas hemorragias.

Al examen microscópico el riñón de las lauchas inoculadas con toxina de vibrión séptico muestra degeneración tubular, principalmente de los tubos de Henle y de los tubos colectores; con todo la necrosis del epitelio cesa repentinamente en la conjunción del cortex con la médula.

Prácticamente todas las lauchas muestran alteraciones degenerativas de los tubos. Estas varían en intensidad y son de distribuición irregular. Nótase degeneración glomerular y hemorragias difusas y focales peri, intra y subcapsulares.

Los vasos de la región medular están muy distendidos. Se ha visto con frecuencia trombonecrosis de vasos de calibre medio y de capilares.

El Bazo esá distendido y friable. Las lesiones sólo pueden ser bien caracterizadas cuando las lauchas inoculadas con la toxina de vibrión séptico viven más de 7 horas. Nóta-se congestión de los senos y de la pulpa, grados variables de extravasación hemorrágica en la pulpa con modificación de su arquitectura; picnosis nuclear y cariolexis de los linfocitos foliculares de la pulpa y fagocitosis de los restos celulares por las células del retículo; degeneración nuclear y fragmentación de las células linfoides de los corpúsculos de Malpighi.

Prácticamente los animales muestran considerable cantidad de pigmento sanguíneo en el bazo. Este pigmento puede ser visto libre en la pulpa o en las márgenes del corpúsculo de Malpighi y fagocitado en cantidad variable por las células del retículo y por los macrófagos libres de la pulpa y de los espacios libres vasculares.

El hígado, en general está ingurgitado por sangre. Este ingurgitamiento se verifica principalmente en las sinuosidades de las venas centrales. En las áreas necróticas se constatan algunos trombos hialinos. Las células hepáticas aparecen frecuentemente entumecidas, este entumecimiento es tan grande que puede llegar a obliterar los sinusoides. Las células hepáticas son hialinizadas, generalmente intensamente eosinofílicas, mostrando picnosis nuclear marcada o moderada. El pigmento sanguíneo puede ser encontrado o en la célula hepática o en la célula de Kupffer.

Los pulmones permanecen generalmente normales; a veces presenta zonas de congéstion o edema y extravasación hemorrágica. Las cápsulas suprarenales están generalmente normales.

Determinación de D M L.

Esta determinación se realiza usando lauchas blancas de 17 a 20 gramos, inoculadas por vía venosa.

La D M L es en general 24 veces menor que 1 L-t.

Preparación de la toxina seca.

Se prepara de acuerdo a la técnica empleada para la preparación de la toxina seca del *Cl. perfringens.*

Determinación de D M L de la toxina seca.

Diluir la toxina seca en solución salina fisiológica o caldo con pH 7.0 e inocular lauchas de 17 a 20 gramos por vía venosa en un volumen total de 0.5 c.c.

Sólo aprovecharmos para toxina Patrón en los dosages de suero las que tengan gran poder toxígeno. Las más débiles usamos para immunización.

II. — Preparación del suero antiodematis-maligni (vibrión séptico).

Immunización

El animal de elección para la preparación del suero antivibrión séptico, es el caballo. Es necessario seguir el curso de la inmunización con todo cuidado, verificando siempre los cuadros de peso y de temperatura. Si el peso cayera visiblemente, se debe espaciar las inoculaciones, asimismo cuando las reacciones térmicas son fuertes.

Los caballos pueden morir con dosis tóxicas ligeramente "super limiares", en virtud de la ley del "todo o nada" estudiada por Lautenschlager.

Oms (9) refiere algunos casos de fracasso de la inmunización de animales en grado avanzado de inmunización. Nosotros hemos advertido también la necessidad de que los animales sujetos a la preparación de suero antivibrión séptico, sean mantenidos permanentemente a la vista de los encargados de este servicio, hasta el final, en virtud de accidentes desagradables que ya hemos presenciado por falta de esos cuidados.

La inmunización se inicia con anatoxina y suero gangrenoso polivalente (sólo en la primera dosis), pasándose despuées a anatoxina centrifugada, más cuerpos microbianos, inoculados directamente en la vena o mixturado con anatoxina. Alcanzado a 300 c.c. de anatoxina se practica la sangría de prueba. Si el suero del animal presentare antitoxina circulante, se podrá pasar directamente a la inoculación de la toxina pura o associada a cuerpos microbianos. Las toxinas usadas para estas inoculaciones deberán ser frescas y nunca toxinas conservadas.

Nosotros jamás empleamos para la inmunización toxinas con más de 48 horas, esto es, sólo empleamos con tiempo justo para esperar el dosage subsiguente y poder constatar si la toxina a usarse, tiene poder tóxico.

A los antígenos específicos associamos, a veces, ciertos antígenos inespecíficos, tales como la tapioca, el cloruro de calcio o lanolina. Numerosos de nuestros animales fueron inmunizados con anaculturas. La adición de cuerpos microbianos, permite obtener sueros, al mismo tiempo antitóxicos y antimicrobianos que poseen poder antitóxico y antiinfeccioso más acentuado que los sueros antitóxicos y antimicrobianos solamente.

La vía de inoculación será subcutánea.

Preparación de los cuerpos microbianos.

1.º — Centrifugar las culturas.

2.º — Diluir el depósito de centrifugación en 10% de solución salina, en relación al volumen centrifugado; por ejemplo, si se ha centrifugado 4 litros, se diluirá en 400 c.c. de salina.

3.º — Agregar formol al 4%º, en proporción a la cultura centrifugada.

4.º — Agitar vigorosamente.

5.º — Llevar a la estufa durante 4 días a 37º C.

6.º — Verificar esterilidad para aerobios y anaerobios.

7.º — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica, dos veces seguida, centrifugando cada vez y renovando la solución fisiológica.

8.º — Recoger el depósito en placa de Petri con el mínimo posible de líquido.

9.º — Secar al vacio sulfúrico.

10.º — Triturar en mortero.

11.º — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer la proporción entre la toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos.

Importante. — También aquí, como en el caso del *Cl. perfringens,* el grado de dilución de los cuerpos microbianos tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas dan lugar a placas de induración en el punto de inoculación y a veces grandes abcesos que puedem perjudicar las inoculaciones subsiguientes. Es pues necesario usar volúmenes medios. Dosis de 50 a 100 ó 150 c.c. deberán ser inoculados de acuerdo al peso de microbios a inocular.

Preparación de anacultura.

Es preparada de acuerdo a la técnica de Weinberg y Prevot (18).

Las anaculturas exigen más tiempo que las anatoxinas para que se tornem atóxicas. Como la toxina de vibrión séptico es muy sensible a la accion del formol, pudiendo perder íntegramente su poder antigénico, cuando la acción del formol es demasiado intensa o muy prolongada, es necessario tratar separadamente la toxina y los gérmenes. El formol es adicionado a los cultivos a 5/1000 y conservados a 37º C durante 8 días.

Control. — 10 a 20 c.c. de esta anacultura inoculada al cobayo no debe producir sino tumefacción ligera.

Preparación de anatoxina.

La toxina del vibrión séptico es muy sensible a la acción destrutiva del formol. Se prepara la anatoxina siguiendo da técnica de Weinberg y Prevot (19). La adición de formol torna la toxina del vibrión séptico completamente atóxica mantenida en la estufa durante 48 horas a 37° C.

Control. — Una dosis de 3 a 5 c.c. de anatoxina no debe provocar ninguna reacción inflamatória en el cobayo, ni producir trazos de hemolisis.

III. — Dosificación del suero anti-oedematis-maligni

En 1931 el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga des Naciones (5) recomendó estudiar la posibilidad de adoptar una unidad antitóxica internacional antigangrenosa (oedematis-maligni) basado sobre el mismo principio seguido para la antitoxina perfringens. En 1935, Hartley y White (5) propusieron un nuevo Patrón antitóxico internacional para la antitoxina oedematis-maligni (vibrión séptico) que fue aceptado.

Naturaleza del Patrón

La unidad antiodematis-maligni internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2377 mgs. de preparación seca y estable de suero antiodematis-maligni del National Institute for Medical Research de Hampstead. Por sugestión del Prof. Martin fue especificado que 1 unidad neutraliza una cantidad correspondiente de cerca de 24 dosis mortales para la laucha de la toxina empleada en das experiencias de determinación. Esta unidad es exactamente mitad de la unidad propuesta por MacCoy y casi el doble de la unidad propuesta por Weinberg, Davesne y Prevot. Una unidad francesa es la mitad de la unidad internacional y un cuarto de la unidad MacCoy.

Preparación del suero Patrón.

El suero Patrón es preparado de sangre de un caballo inmunizado contra los cuerpos microbianos y toxina de *Cl. oedematis-maligni.* El suero antiodematis-maligni, para ser usado como patrón, debe tener un título elevado. El suero natural (sin antiséptico de ninguna especie) es reducido a estado seco por los medios comunes hasta peso constante y conservado en ampollas al abrigo de la luz y a la temperatura de 4° C.

Uso del Patrón

El suero Patrón de acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) debe ser disuelto en solución glicerinada (glicerina 2 partes, solución salina 1 parte).

El poder antitóxico de los sueros antiodematis-maligni en unidades internacionales es determinado por inyecciones en animales (lauchas blancas, cobayos) de una mixtura de la antitoxina en prueba con la toxina oedematis-maligni, patrón que fue standardizada en relación al suero Patrón antioedematis-maligni.

Animales usados.

Se usan en las determinaciones por vía venosa, lauchas blancas de 17 a 20 gramos. En los dosages por vía intracutánea se emplean cobayos albinos de 300 a 400 gramos.

Toxina Patrón para los dosages.

Para los dosages de los sueros antioedematis-maligni (vibrión séptico) es necessario standardizar las toxinas oedematis-maligni (vibrión séptico) en relación al suero Patrón antioedematis-maligni (vibrión séptico).

Determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón.

La determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón puede efetuarse por dos métodos:

I). — Por inyección intravenosa en lauchas blancas de 17 a 20 gramos.

II). — Por inyección intracutánea en cobayos albinos rasurados en los flancos o depilados y cuyo peso ha de ser de 350 a 400 gramos.

I). — Por inyección intravenosa en lauchas blancas:

Definición. — Test-Dosis (L t) de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) es la cantidad de toxina Patrón que unida con 1 unidad de antitoxina Patrón mata algunos, mas no todos los animales inoculados.

Para determinar el test-dosis (L t) de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) se prepara las diluciones siguientes:

a). — 1 c.c. de antitoxina Patrón es diluída de tal manera que 1 c.c. contenga 5 unidades antitóxicas.

b). — Una cierta cantidad de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) es cuidadosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica con pH 7.0. El volumen final debe ser completado de tal manera que 1 c.c. de la solución de toxina contenga 20 miligramos.

c). — Las mixturas de cada una de las diluciones de antitoxina Patrón son hechas en un volumen total de 0.5 c.c. (cantidad a ser inoculada intravenosamente en cada laucha) la que deberá contener 0,2 c.c. de antitoxina diluída (1 Unidad) más cantidades variables de la solución de toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 hora, siendo inyectadas intravenosamente la cantidad de 0.5 c.c., a grupos de 6 lauchas. Las lauchas deben ser elegidas de un stock de animales de peso uniforme, esto es de 17 a 20 gramos. Las lauchas inoculadas serán observadas durante 3 días, precisando conservarlas a temperatura constante. La mayoría de los animales mueren en las primeras 24 horas, ocurriendo muy raras muertes con 72 horas.

El test-dosis, contienne en general 24 D M L.

Cuando la dosis de toxina es muy elevada todos los animales mueren. Cuando las dosis están próximas al test-dosis (L t), algunos animales mueren, otros quedan enfermos y tristes y otros sobreviven.

En la determinación del test-dosis de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) raramente tuvimos la proporción de 50% de muertes. En general encontramos proporciones aproximadas o alejadas (1/6, 2/6, 5/6).

Dosage de antitoxina de gangrena gaseosa oedematis-maligni (vibrion septico) de valor desconocido

(Dosages previos).

Preparar las diluciones siguientes:

a). — Dilución el suero en prueba.

b). — Preparar la dilución de toxina Patrón.

La toxina es rigorosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica, de manera que 1 test-dosis este contenido en 0.2 c.c.

Las mixturas de las diluciones del suero a dosar con el test-dosis son hechas en volumen total de 0.5 c.c. en tubos especiales, el que debe contener cantida-

des variables del suero a dosar diluído, más 0.2 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de solución salina para completar el volumen total de 0.5 c.c.

Esta solución salina servirá para lavar el tubo, después de haber retirado la mixtura suero-toxina.

Las diluciones antes de inoculadas son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente.

La dosis total de 0.5 c.c., es inoculada intravenosamente a 4 lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidas a temperatura constante.

Aconsejamos usar siempre pipetas certificadas para hacer las diluciones.

Para las inoculaciones serán empleadas jeringas metálicas de 1 c.c. divididas en centécimos y munidas de agujas de platino; una seringa para cada serie de diluciones. Las lauchas inoculadas serán observadas durante 72 horas.

Testigos. — Cada dosage será acompañado de su testigo. Sin este requisito los dosages no tendrán valor. Los testigos serán inoculados con una mixtura de 1 unidad de suero patrón antiodematis-maligni (vibrión séptico), más 1 test-dosis y cantidades mínimas de toxina, superiores e inferiores a este test-dosis.

Estos testigos son imprescindibles a fin de constatar si la cantidad de toxina empleada como test-dosis ha sido exacta o si hubo variación en más o en menos.

El porcentaje de animales sobrevivientes indica la protección aproximada conferida por el suero en prueba.

Dosages definitivos.

La técnica a seguir es la misma que la empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos el número de animales de experiencia debe ser aumentado a 10 ó 12 para cada dosis.

II) Por inyección intracutánea en cobayos de 300 a 400 gramos.

La toxina y antitoxina de vibrión séptico pueden ser medidas con apreciable precisión por inyección intracutánea. Hartley y White (5) hallan este método, simple, conveniente y económico, pudiendo prorporcionar resultados comparables a los obtenidos por el método de inyéccion intravenoso en lauchas.

La toxina líquida, no obstante más estable que la toxina del *Cl. perfringens* se deteriora tornandose inutil como toxina test.

La toxina a ser usada debe por tanto ser seca. En estas condiciones conserva su poder tóxico por lo menos tres años.

Primero debe verificarse el aspecto de la reacción producida en la piel del cobayo. Prepáranse concentraciones variables de toxina en un volumen invariable de 0.2 c.c. Usualmente dosis de 0.5 mgs. producen lesiones necróticas muy extensas, y 0.025 mgs. no produce reacción. Deben inocularse dosis intermedias entre 0.5 mgs. y 0.025 mgs. debiendo cada observador conceptúé más conveniente para inocular y a distancia conveniente entre ellas.

Lo cobayos albinos de 300 a 40 son los mejores; en cada flanco puede hacerse 5 inyecciones. Las lecturas son hechas a las 24 horas, y la lectura final a las 48 horas.

Para determinar el test-dosis intracutáneo preparar las siguientes diluciones:

a). — La antitoxina es diluída de tal manera que 1 c.c. contenga 5 unidades.

b). — Una cierta cantidad de toxina seca es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0 El volumen debe ser completado de tal manera que 1 c.c. contenga 30 mgs. de toxina.

Hacer una serie de mixturas de toxina de antitoxina en volumen total de 2 c.c., 5 unidades son mixturadas con cantidades variables de toxina. Las mixturas son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente; retirase 0.2 c.c. de cada mixtura e inyéctase por vía intracutánea; cada losis inyectada, por tanto, contiene 0.5 unidades de antitoxina, más la cantidad total de 0.1 de toxina contenida en los 2 c.c. de mixtura. Se determina así Lr, esto es la cantidad contenida, en los 2 c.c. de mixtura. Se determina así $\frac{Lr}{2}$, esto es la cantidad de toxina que unida a media unidad de antitoxina e inyectada intracutáneamente produce una reacción pequeña pero característica en la piel del cobayo.

Los resultados obtenidos por Ssilanowa (15) muestran que el método intracutáneo, por sus resultados concordantes con aquellos obtenidos en lauchas, puede servir perfectamente como método auxiliar para el dosage de los sueros antiodematis maligni (vibrión séptico).

a). — DETERMINACIÓN DE LR (1)

Sol. de antitoxina	Cantidad	Mixtura preparada Volumen 2. c. c.		Dosis inyectada	Resultado después de 24 horas
		Toxina	Antitox.		
	c. c.	Mgs.			
	0,9	27			Reac. severa. Necrosis.
ANTITOXINA PATRÓN INTERNACIONAL.	0,85	25,5	1. c. c. = 5 unidades	0,2 c. c.	Reac. poço int. Necrosis.
	0,8	24			Reac. moderada. Necrosis.
	0,75	22,5			Reac. debil.
	0,70	21			Ausencia reac.
	0,65	19,5			Ausencia reac.

b). — VERIFICACIÓN DE LR

Solución de antitoxina	Mixtura preparada Volumen 2 c. c.			Volúmen de mixtura inyectada	Resultado después de 48 horas
	Toxina	Antitoxina			
		c. c.	Unidades		
	Mgs.				
ANTITOXINA PATRÓN INTERNACIONAL.		0,90	4,50		R. severa, Necrosis
	24	0,95	4,75	0,2 c. c.	R. severa, Necrosis
		1,00	5,00		Reac. moderada
		1,05	5,25		Reac. débil
		1,10	5,50		Ausencia de Reac.

C. — DOSAGE DE ANTITOXINA OEDEMATIS-MALIGNI (VIBRIÓN SÉPTICO) DE VALOR DESCONHECIDO

N.	Toxina 24 mgs. en 1 cc.	Antitoxina Dil. 1/20 c. c.	Salina c. c.	Volúmen de mixtura inyectada intramuscular	Cantidades inyectadas		Resultado después de 48 horas
					Toxina Mgs.	Antitoxina c. c.	
1							
2	0.8	0.555	0.645	0.2 c. c.	2,4	0.00278	R. severa. Necrosis
3	0.8	0.585	0.615	0.2 c. c.	2,4	0.00293	R. severa. Necrosis
4	0.8	0.625	0.575	0.2 c. c.	2,4	0.00313	R. moderada
5	0.8	0.675	0.525	0.2 c. c.	2,4	0.00338	R. débil
6	0.8	0.715	0.486	0.2 c. c.	2,4	0.00367	Ausencia Reacción
Ds		5. Unid. en 1 ce.	0.	0.2 c. c.	2,4	0.5 Unid.	Reac. moderda

(1) Del trabajo de Bengtson (2) tomamos algunos ejemplos de dosage por vía intracutánea.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "Studies on the standardisation of V. septique antitoxin". Public Health Rep. 49:251.1934.

2. *Bengtson, I. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardizing gas gangrene antitoxin (Vibrion septique)". Public Health Rep. 49(52): 1557.1934.

3. *Ficker, M.* — "Ueber ein Toxin des aus Gasbrandfallen isolierten Bacillus oedematis-maligni". Med. Klin. Ber. 13:1181.1917.

4. *Karube, H.* — "Studien ueber Toxin von Vibrion septique". Japan Jour. Exper. Med. 12:151.1934.

5. *Hartley, P.* y *White, P. B.* — "A proposed international standard for gas gangrene antitoxin (Vibrion septique)". Quarterly Bull. Health Organisation League Nations — Special Number — Biological Standardisation — Extract A: 1.1935.

6. *Leclainche, E.* y *Morel, C.* — "La sérothérapie de la septicémie gangreneuse". Ann. Inst. Pasteur 15:1.1901.

7. Medical Research Committe. — "Reports of the Committe upon Anaerobic Bacteria and infections. Report on the Anaerobic Infections of wounds and Bacteriological and Serological Problems arising therefrom". Special Report Series n.° 39.1919.

8. *Nicolle, M.; Césare,* y *Raphael, A.* — "Etude sur le Vibrion septique et le "Bacterium chauvoei". Ann. Inst. Pasteur 29:165.1915.

9. *Oms, F. V.* — "Preparación del suero antigangrenoso". Editor Morata — Madrid, 1929.

10. *Pasternack, J. C.* y *Begtson, I. A.* — "The experimental pathology and pathology histology produced by the toxin of Vibrion septique in animals". National Inst. Health Bull. 168.1936.

11. Rapport de la Commission Permanente de Standardization Biologique". C H 1056. Londres 23 Juin, 1931.

12. *Raphael, A.* y *Frasey, V.* — "Toxine du Vibrion septique et antitoxine correspondente". C. R. Acad. Sc. 161:361.1915.

13. *Roux* y *Chamberland* — "Inmunité contre la septicémie conferée par des substances solubles". Ann. Inst. Pasteur 1:561.1887.

14. *Robertson, M.* — "Serological groupings of Vibrion septique and their relation to the production of toxin". Jour. Pathol. Bact. 23:153.1919-1920.

15. *Ssilanowa, J. W.* — "Zur nitrakutanen Wertbstimmung der Gasodematoxine und Gasodemsera (Anti-perfringens, anti-histolytikus und anti-vibrion-septique) und Kaninchen. Centralblatl, fur Bakt. I. 133:149.1935.

16. *Walbum, L. E.* y *Reymann, G. C.* — "The production of toxin by Bacillus oedematis-maligni (Vibrion septique), Jour. Pathol. Bact. 42(2):351.1936.

17. *Weinberg, M.; Nativelle, R.* y *Prevot, A.* — "Les microbes anaerobies". Masson & Cie. Paris, 1937.

18. *Weinberg, M.* y *Prevot, A.* — "De l'emploie des anatoxines pour la preparation des serums antigangreneux". C. R. Acad. Sc. 179:227.1924.

19. *Weinberg, M.* y *Prevot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses, leur emploi dans la vaccination du cobaye et la preparation des serums specifiques". C. R. Soc. Biol. 92:1484.1925.

20. *Weinberg, M.* y *Seguin, P.* — "Quelques documents sur la preparation de la toxine et de l'antitoxine du Vibrion-septique". C. R. Soc. Biol. 80:715.1917.

21. *Witte, J.* y *Schaaf, J.* — "Veber die specifizitat und therapeutische Wirkung von Gasodemserum" Zentral, für Bakteriol. Or. 87:122.1931.

22. *Wuth, O.* — "Bioch. Ztschr. 93, 289, 1919 apud Walbum e Reymann". Jour. Path. Bact. 42(2):351.1936.