615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

V. Estandardización del suero antigangrenoso

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

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

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

I. — Suero antiperfringens.

En el año 1930 la Comisión Permanente de Standardización Biológica de la Organización de Higiene de la Sociedad de Naciones (10) teniendo en cuenta las recomendaciones de la Conferencia sobre Standardización de Francfort (1928), estudió la posibilidad de un acuerdo internacional relativo a la adopción de un patrón para suero antigangrenoso (perfringens).

De acuerdo a los resultados alcanzados por los técnicos encargados de dar opinión sobre el Patrón internacional antigangrenoso (perfringens) resolvió la Comisión (10) *recomendar como Patrón y unidad internacional, la preparación Patrón y la Unidad adoptada en los Estados Unidos de América* y encomendar al "Statens Serumistitut", para funcionar como Laboratorio Central de la Organización de Higiene de la Sociedad de Naciones y asimismo conservar y distribuir esta preparación Patrón internacional.

De acuerdo con el método entonces propuesto:

1.º — El suero antigangrenoso (perfringens) podia ser dosado con gran precision.

2.º — El método de inyeccion intravenoso en lauchas, de la mixtura de toxina y antitoxina es simple y práctico, dando resultados concordantes y comparables aplicado por investigadores diversos.

3.º — Las preparaciones estables y secas de suero antigangrenoso (perfringens) pueden ser estabilizadas y tituladas en relación al Patrón americano, siendo posible preparar soluciones perfectamente patronizadas, proprias para ser remitidas a los laboratorios y ser usadas en dosages biológicos.

La unidad internacional adoptada corresponde a 1/100 de Unidad americana, anterior a las "Instrucciones Oficiales" del 10 de Diciembre de 1930 del National Institute of Health.

Para relacionar, pues, unidades internacionales a unidades americanas *antiguas,* se debe multiplicar los resultados por 100.

Procurando relacionar el valor terapéutico de suero perfringens a los títulos obtenidos en unidades internacionales, Weinberg, Davesne y Prevot (18) pudieron concluir que el suero antiperfringens titulado 100 unidades antitóxicas por c.c. protege los cobayos por lo menos contra 2 D M L de cultura de Cl. perfringens, mismo en la dosis de 1/200 c.c. Sueros antiperfringens medios deben dosar por lo tanto como mínimo 100 unidades antitóxicas por c.c. para tener valor terapéutico.

Prigge (11) por orden del Ministerio de Guerra del Reich realizó exriencias en las cuales se basaron las "Vorschriften für die staatliche Prüfung-der (Perfringens) Sera" de 1 de Mayo de 1937. (11).

Para poder ser usadas en las dosificaciones las toxinas deben ser ricas en Z-toxinas, factor principal de la intoxicación perfríngica esencial y contener porcentaje mínimo de componente hemotóxico W o Alfa-toxina.

Según las instrucciones, sólo son considerados dosando, los sueros que protegen un número de animales mayor o más o menos igual a aquellos animales protegidos por el suero Patrón. Para esto es necessario trabajar siempre con lotes grandes de animales, teniendo en cuenta que las variaciones en la relación individual es tan grande, que análisis realizados al mismo tiempo, con el mismo suero y con las mismas dosis de toxina pueden no presentar resultados idénticos.

El factor reaccional individual sólo puede ser menospreciado cuando se usan series grandes de animales. Aun así, no siempre se puede esperar que sobrevivan 50 % o mueran 50 %. Si son usados seis animales, los números de sobrevivientes son bastante diferentes: 2/6, 4/6 ó hasta 1/6. Estos hechos deben ser tomados en cuenta cuando se organizan estadísticas *muerte/vida.*

Las instrucciones del Ministerio de Guerra del Reich exigen para el suero antiperfringens la tasa mínima de 100 unidades internacionales de antitoxina por c.c.

Estas exigencias son provisorias, pues el título mínimo tendrá que ser elevado en cuanto se torne posible la obtención de sueros con títulos medios más altos.

Weinberg y Guillaumie (19) verificaron que el método recomendado por la Liga de las Naciones no daba una precision rigurosa; los títulos, sólo eran títulos aparentes y no títulos reales.

Los dosages mostraron la inexistencia de regularidad en las variaciones de los títulos antitóxicos obtenidos, dosando varios sueros con varias toxinas, y dosando varios sueros con la misma toxina.

Estas variaciones fueron atribuídas en principio, a la constitución de la toxina, a la constitución del suero específico o a la reactividad del animal usado para la prueba. Alejado el tercero factor, mediante un criadero bien dispuesto y perfectamente controlado, se admite generalmente que las variaciones del título antitóxico son debidas, sobre todo, a la variabilidad de la constitución de la toxina y la calidad del suero. Los títulos reales de los sueros antitóxicos perfringens, deben ser obtenidos, con toxinas bastante purificadas, a fin de reducir al mínimo las influencias que ejercen sobre los resultados los constituyentes no específicos del suero.

Estas variabilidades de los títulos antitóxicos, pueden ser tal vez atenuadas empleando toxinas-tipo preparadas con nuestras de *Cl. perfringens* aisladas por el método de las células únicas y cultivadas en medios sintéticos apropriados.

A fin de obtener títulos comparables, sería aconsejable que las titulaciones de los sueros específicos fueran practicados con test-dosis de una toxina estabilizada y remitida juntamente con la toxina Patrón por la Comisión Permaniente de Estandardización Biológica de la Liga de las Naciones.

Con el fin de conseguir el valor real o valor terapéutico de un suero antiperfringens, recomiendan los autores arriba citados (20) que el suero Patrón sea preparado con un suero de título antitóxico muy elevado, o mejor aun, con una mixtura de sueros específicos de titulos los más elevados posibles, o que las mixturas utilizadas en las titulaciones sean ricas en cada uno de los anticuerpos exo y endotóxicos de *Cl. perfringens,* tipo A.

Otras veces los títulos bajos hallados para un determinado suero antiperfringens tipo A, cuando se usa una cierta toxina tipo A, no es real sino aparente, porque la neutralización de la toxina por los anticuerpos del suero examinado es imposibilitado por constituyentes no específicos del suero o por constituyentes no específicos de la misma toxina. O cierto antígenos de la toxina no son neutralizados por el suero o es que falta en el suero ciertos anticuerpos capaces de neutralizar estos antígenos correspondientes o finalmente porque los contiene en débil proporción. Además el *Cl. perfringens* en medios culturales diferentes y con período de incubación también diferentes, produce antigenos tóxicos en proporciones variables.

El valor del test-dosis de cada muestra de toxina varía con los sueros usados para las titulaciones; esta variación es debida a la variabilidad de la constitución de las toxinas y de los sueros.

La neutralización de la toxina de *Cl. perfringens* tipo A por su suero homólogo es un problema muy complejo y todavía se complica más, cuando se encara la neutralización de las varias toxinas de los diferentes tipos de *Cl. perfringens* por su holosuero homólogo, pues estas variaciones pueden ser también observadas cuando se determinan los títulos antitóxicos de sueros antiperfringens tipo C y tipo D por las toxinas homólogas (22).

El título antitóxico real de un suero debería indicar su riqueza en anticuerpos contra todas las toxinas de una especie microbiana, lo que se tornara posible, sólo cuando se consiga disociar o purificar todos los constituyentes específicos de la toxina perfringens tipo A o de los sueros antiperfringens tipo A. Los resultados de los dosabes serán perfectamente comparables cuando todos los laboratorios usen las mismas toxinas y las mismas unidades de sueros antiperfringens tipo A. Y se comprende que sea así, admitiendo que una unidad padrón es en cierto modo una entidad localizada y definida y no un fenómeno abstracto; ella existe realmente y está situada en el espacio, según opina Jensen (9).

El método de elección para determinar el valor de un suero antiperfringens es la determinación de su titulo curativo. El suero Patrón antiperfringens actualmente es enviado por el Laboratorio Central de Statens Seruminstitut a los laboratorios interesados. Sería útil que cada país tuviese un Laboratorio Seroterapico Oficial como es el Instituto Seroterápico Butantan que pudiese distribuir substandards locales patronizados en relación a los Patrónes de la Liga de las Naciones enviados por el Statens Seruminstitut. Estas substandards locales seriam preparados con toxinas autóctonas y estas producidas por muestras de Cl. perfringens tipo A aisladas de casos locales de gangrena humana, los sueros Patrónes seriam de otra parte preparados con estas toxinas autóctonas. Tal vez las muestras de determinadas regiones puedan producir de esta manera factores tóxicos ausentes en muestras oriundas de outras regiones. Estos sueros patrones y toxinas enviadas como substandard tal vez contribuyan a la obtención de mejores sueros, de resultados terapéuticos más eficientes.

II. — Estandardización del suero antioedematis maligni (vibrión séptico).

La Comisión Permanente de Patronización Biológica reunida en Londres el 23 de Junio de 1931 recomendó que fuese estudiada la posibilidad de realizar un acuerdo internacional para la adopción de un Patrón para el suero antioedematis maligni (vibrión séptico), tomando por base los mismos principios seguidos para el suero antiperfringens (13).

El National Institute for Medical Resarch de Londres dando cumplimiento a estas recomendaciones estabeleció, gracias a la cooperación del Profesor Weinberg, un nuevo Patrón. Teniendo en cuenta los trabajos del National Institute for Medical Research pudo la Comisión recomendar (14) "que la preparación desecada estable de suero antivibrión séptico establecido por National Institute for Medical Research de Londres con ayuda de los productos puestos a su disposición por el Profesor Weinberg del Instituto Pasteur de París, sea adoptado como Patrón Internacional de este suero, y que una unidad internacional sea definida como la actividad antitóxica especifica ejercida por 0.2377 mgs de esta preparación Patrón desecada."

Por sugestión del Profesor Martin fue especificado que una unidad neutraliza una cantidad correspondiente a cerca de 24 D. M. L., para la laucha, de la toxina usada en las experiencias de determinación.

El suero antioedematis maligni (vibrión séptico) puede ser dosado de acuerdo con la técnica propuesta por Hartley y White (7).

La unidad internacional propuesta equivale a la mitad de una unidad americana y a 2 unidades franceses, siendo 5 veces menor que la unidad soviética.

1 unidad internacional es igual a 0.2 unidad soviética, igual a 0.5 unidad americana e igual a 2 unidades francesas..

1 unidad franiesa es igual a 0.5 unidad internacional e igual a 0.25 unidad americana.

Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institute of Health de Washington (2) y adoptada oficialmente desde 1.º de Junio del año 1935.

Para obtener resultados en unidades internacionales en los casos en que se ha usado el patrón americano antiguo, basta multiplicar los resultados por 2. Y si se ha usado el patrón francês dividir los resultados por 2 a fin de obtener los dosages en unidades internacionales.

La unidad internacional antioedematis maligni es 5 veces menor que la unidad soviética (5).

Antes de los trabajos de Weinberg, Davesne y Prevot (18) se exigía que un suero antivibrión séptico debía tener como mínimo 250 unidades francesas para uso terapéutico, siendo actualmente exigido con este fin el dosage mínimo de 125 unidades internacionales.

Weinberg y Guillaumie (22) demonstraron por otra parte que el suero antioedematis maligni (vibrión séptico) podía ser dosado por el método internacional con un error solamente de 10 a 20 %.

III. — Estandardización del suero antioedematiens.

La Comisión Permanente de Standardización Biológica resolvió en el año 1932 recomendar al "Statens Serum Institute" de Copenhague que hiciese un patrón estable de suero antioedematiens.

Gracias al patrón propuesto per el "Statens Serum Institute" el poder antitóxico de un suero antioedematiens puede ser medido con toda la exactitud deseable. La comisión recomienda (15) "que la preparación desecada estable de suero antioedematiens del "Statens Serum Institute" de Copenhague sea adoptada como Patrón internacional y que una unidad internacional sea definida como la actividad antitóxica especifica ejercida por 0.2681 mgs de esta preparación desecada".

Por sugestión del Profesor Martin fue especificado que: una unidad neutraliza una cantidad correspondiente a cerca de 1400 D M L para la laucha de la toxina en las experiencias determinación.

El suero antioedematiens, puede ser dosado de acuerdo con la técnica propuesta por Walbun y Reyman (16).

La unidad internacional propuesta equivale a 10 unidades francesas y a 50 unidad alemanas.

1 Unidad francesa es igual a 5 unidades alemanas e igual a 0.1 unidad internacional.

La relación entre una unidad internacional y 1 unidad soviética es de 1/3,5.

Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institute of Health de Washington (3) y adoptada oficialmente desde el 1 de Abril de 1936.

El Instituto Tarassévitch de control de sueros y vacunas de Moscou, llama la atención en el sentido de que el método internacional de standardización de suero antioedematiens difiere esencialmente de los métodos usados para los otros sueros. La diferencia no es solamente sobre el valor de la unidad antitóxica sino también sobre la vía de inoculación: la vía venosa es sustituída por la vía muscular.

Experiencias hechas en el Instituto de Medicina Experimental de Leningrado y en el Instituto de Microbiología y Epidemiolgía de Moscou mostraron que los resultados obtenidos por el método intramuscular es mucho menos preciso de aquellos obtenidos por inyecciones endovenosas. A veces por el método intramuscular se constata 100 % de muertes y la otro día con la misma dosis no se ocasiona muerte alguna.

Glotova (5) cree que las dificultades encontradas para estabelecer el test-dosis (L t) de la toxina oedematiens es consecuencia de la vía muscular utilizada. Los músculos del muslo de la laucha, son en efecto, tan pequeños y la cantidad de 0.1 c.c. tan insignificante, que puede acontecer que la extremidad de la aguja toque el hueso o penetrando hasta la aponeurosis, la inyección no sea estrictamente intramuscular. La absorción de toxina es por este motivo retardada y los resultados falsos, pues sabemos que las cantidades mínimas de toxina 0. mg. 1, por ejemplo, puede modificar enteramente los resultados experimentales. Glotova (5) halla que el método intramuscular no es práctico y aconseja el método intravenoso.

Para comparar los resultados obtenidos por el método soviético con los hallados por el método internacional es necesario dividir los resultados obtenidos por 3,5.

Un suero antioedematiens para uso terapéutico, debe dosar 1000 unidades francesas o 100 unidades internacionales.

IV. — Estandardización del suero antihistolyticum.

La Comisión Permanente de Patronización Biológica reunida en Copenhague en Noviembre de 1932 decidió establecer un patrón de suero antihistolyticum, basado en los mismos principios seguidos anteriormente para la preparación del suero antiperfringens.

Existiendo dos unidades: una francesa preconizada por Weinberg y otra alemana preconizada por Schmidt los dosages demostraron que 1 unidad francesa equivalia a 3 unidades alemanas.

Por razones de orden práctico fue recomendado por el "Statens Serum Institut" (17) que fuese adoptada como patrón internacional la unidad francesa.

1 unidad internacional es igual a 3 unidades alemanas e igual a 1 unidad francesa.

La Comisión recomienda (8) que la preparación seca y estable de suero antihistolítico del "Statens Serum Institut" de Copenhague sea adoptada como patrón internacional y que como unidad internacional sea adoptada la unidad antihistolítica de Weinberg. El equivalente de esta unidad internacional es la actividad antitóxica específica ejercida por 0.357 mgs de preparación seca y estable de suero antihistolítico del "Statens Serum Institut" de Copenhague.

El suero antihistolítico puede ser dosado de acuerdo con la técnica de Walbum y Reymann.

Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institue of Health de Washington (4) y adoptada oficialmente desde el 1.º de Noviembre de 1936.

El método de dosage internacional del suero antihistolítico es análogo al método soviético. No se diferencia sino en el valor de la unidad antitóxica: 1 c.c. de suero patrón soviético (como todos los otros sueros patrónes soviéticos) contiene 1 unidad antitóxico y no 5 unidades antitóxicas como en el patrón internacional. Así 1 unidad antitóxica soviética es 5 veces mayor que 1 unidad internacional. Para conocer pues el poder antitóxico de un suero soviético en unidades internacionales es necesario multiplicar su título por 5.

El método internacional da gran precisión en los dosages de sueros antihistolíticos. El test-dosis de las toxinas histolíticas puede ser avaluada con gran precisión sea con suero patrón francés, sea con suero patrón dinamarqués.

Weinberg y Guillaumie (22) determinando el título antitóxico de un suero antihistolítico usando test-dosis de diferentes toxinas histolíticas obtuvieron resultados que no diferían en más de 15 %.

Un suero histolítico para uso terapéutico debe dosar 250 unidades francesas que corresponden a 250 unidades internacionales.

.....

Provisioriamente se puede admitir como mínimo de dosage para los diferentes sueros antigangrenoso:

100 unidades antitóxicas internacionales pertringens por c.c.

125 unidades antitóxicas internacionales antioedematis maligni (vibrón séptico) por c.c.

100 unidades antitóxicas internacionales antiodematiens por c.c.

250 unidades antitóxicas internacionales antihistolyticum por c.c.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, J. A.* — Rapport de la Comission Permanente de Standardisation Biologique. C. H. C. P. S. 31: 23. 1931.
2. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardizing gas gangrene antitoxin (vibrion septique)" Public Health Reports 49 (52): 1567.1934.
3. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardzing gas gangrene antitoxin (Oedematiens)" Public Health Reports 51 (11): 266. 1936.
4. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (histolyticus)" Public Health Reports 51 (37): 1263. 1936. 2 2 2
5. *Glotova, H. W.* — "Etude Comparée des serums étalons antigangréneux internacionaux et sovietiques". An. Inst. Pasteur 59 (5): 526. 1937.
6. *Hartley, P.* — "Recherches internationales relatives a l'adoption d'un etalon pour le serum antigangréneux (Perfringens) et la definition d'une unité calculée par rapport a cet étalon". — Rapport de la Comission Permanente de Standardization Biologique. C. H.| C. P. C.|31.
7. *Hartley, P.* y *White, B P.* — "Memorandum sur un étalon international pour le serum antivibrion septique". Bull. Trimet de l'Organis. d'Hygiene. Numero special: 33. 1935.
8. *Jensen,* Cl. — "Etalon internacional proposé pour le serum antihistolitique". Bull. Trimet de l'Organis d'Hygiene 5: 720. 1936.
9. *Jensen, Cl.* — "Rapport sur les étalons biologiques internationaux conservés an Statens Serum Institut pour le Compte de l'Organisation d'hygiene de la Societe des Nations". Bull. Trimest. de l'Organizat. d'Hygiene 5: 790. 1926.
10. "Memorandum on the Standard for gas gangrene antitoxin (perfringens) and its aplication" — Permanent Commission on Biological Standardisation — League of Nations C. H.| C. P. S. B.|23, Geneve, 1935.
11. *Prigge, R.* — "Ueber Wirksamkeit und Antitoxingehalt de Gasbrandseruns". Deut Med. Wochensc. 63 (51): 1906. 1937.

11a "Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (Perfringens) Sera.. Ministerioblatt d. Reichs-und Preus Ministeriums des Innern. (15): 591. 1937.

12. "Serum antigangreneux (Perfringens)" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique C. H. 1056: 5. 1931.
13. "Serum antigangreneux (vibrion septique)" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique — Bull. Trimet de l'Organis. d'Hygiene —

4. "Serums antigangreneux a) vibrion septique" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique — Bull. Trim. de l'Organis. d'Hygiene — Numero special: 1. 1935.

16. *Walbum, L. E.* y *Reymann, C.* — "Etalon internactional proposé pour le serum anti-oedematiens. Bull. Trim. de l'Organisat. d'Hygiene. Numero special: 42. 1935.
17. *Walbum, L. E.* y *Reymann, G. C.* — "Memorandun sur un étalon international pour le sérum anti-histolitique". Bull. trimet. de l'Organis. d'Hygiene **5**: 752. 1936.
18. *Weinberg, M., Davesne, J.,* y *Prevot, A.* — "Recherches sur la standardisation des sérums antigangreneux. An. Inst. Past. **49** (4): 386. 1932.
19. *Weinberg, M.,* y *Guillaumie, M.* — "Titres apparents et titres reels des serums anti-toxiques" — C. R. S. Biolog. **123** (31): 661. 1936.
20. *Weinberg, M.* y *Guillaumie, M.* — "Nouvelles recherches sur la titrage des serums antiperfringens". C. R. S. Biol. **126** (30): 656. 1937.
21. *Weinberg, M.* y *Guillaumie, M.* — Titrage des serums antitoxiques". Acad. Sciences **204** (12): 1012.
22. *Weinberg, M.* y *Guillaumie, M.* — "Titrage des serums antigangreneux (antiperfringens D, antihistolitique et anti Vibrion septique" — C. R. Biolog. **127** (12): 1084. 1938.

(Publicado tambem na Revista de Sanidad Militar da Republica do Paraguay *10*(91/94) :657 a 773, Julio a Octobre de 1938).