

Producción de hemolisinas y concentración de antisueros específicos por congelaciones y descongelaciones sucesivas

Por el doctor **JAIME DEL VALLE LEANDRO**

Introducción

Al realizar este trabajo me he propuesto solucionar un problema que, si bien no representa un obstáculo fundamental, sí interfiere con el desarrollo normal de la rutina del laboratorio cuando es empleada la técnica de Fijación de Complemento como método de diagnóstico.

Uno de los elementos empleados en la prueba de Fijación de Complemento, y cuyas características son de las más estables, es la Hemolisina o Amboceptor Hemolítico, el cual, precisamente por esa condición, es pocas veces valorado durante su empleo después de su producción. Todos los autores están de acuerdo en que no deben emplearse hemolisinas cuyo título sea inferior de 1: 2.400 a 1: 3.000. Es un hecho frecuente observar durante el proceso de producción de Hemolisinas, que éstas no alcancen a dichos títulos, obteniéndose valores que oscilan entre 1: 800 y 1: 1.600. Son múltiples las causas que pueden influir sobre la concentración de anticuerpos anti-glóbulo rojo de carnero en el suero de los conejos inmunizados: edad, se-

xo, peso y estado sanitario de los animales, método empleado en la inmunización, etc.

Mi propósito en la primera parte de este trabajo, era establecer cual de los métodos empleados ofrecía mejores probabilidades de obtener títulos elevados. Desafortunadamente, en la época en que este trabajo se llevó a cabo, solo pudo obtenerse un grupo muy reducido y heterogéneo de animales, por lo cual los resultados obtenidos no pudieron ser más concluyentes.

La segunda parte de este trabajo comprende la aplicación de un procedimiento de concentración de sueros inmunes, por congelaciones y descongelaciones sucesivas, empleado en la concentración de sueros para el diagnóstico de la Fiebre Aftosa, a las Hemolisinas. Es en realidad un hecho notorio que cuando se conservan sueros en congelador y por cualquier causa sufren una descongelación y nuevamente se congelan, puede observarse un comienzo de "separación", que se manifiesta por un color obscuro de la porción que tiende a sedimentarse, y un color claro de la que se localiza en la parte superior.

Este hecho, y los resultados obtenidos con los sueros de diagnóstico para la Fiebre Aftosa, me indujeron a emplear este procedimiento para la concentración de las Hemolisinas, con resultados satisfactorios.

II — Consideraciones teóricas

Hemolisinas

Las Hemolisinas son anticuerpos del suero que cuando actúan con el complemento tienen el poder de lisar o destruir los glóbulos rojos, o alterar su membrana permitiendo la salida de la hemoglobina.

La naturaleza de las Hemolisinas es desconocida; no son sustancias químicas; algunos autores creen que son de la naturaleza de los fermentos lipolíticos; para otros, las Hemolisinas son identificadas con la fracción globulina del suero, en contradicción con las Hemolisinas producidas por bacterias, que en el concepto de Cornell y Holby, y otros, son considerados como grasas bacteriales en estado coloidal.

Complemento

El complemento o alexina es una sustancia presente tanto en el suero normal, como en el inmune, la cual es destruida por calentamiento a 56° C. y que actúa en presencia de un amboceptor o sensibilizador para producir lisis.

Ordinariamente el complemento no está unido a las células, sino que se encuentra libre en el suero sanguíneo. Es de estructura simple, y está compuesto de una porción haptóphora y una porción tóxica, lítica, llama-

da grupo citolítico o toxóphoro. Es similar en estructura a una toxina, pero funciona y actúa de diferente manera. El grupo haptóphoro permite la combinación con los anticuerpos anclados en la célula y prepara el efecto lítico cumplido por el grupo toxóphoro.

El complemento se deteriora rápidamente después de obtenido, pero su actividad puede preservarse por varios procedimientos, de los cuales los más empleados son: la congelación, la sublimación o liophilización o la adición de preservativos químicos, como el de Witte y otros.

El complemento se encuentra en el suero de los animales y del hombre en cantidades variables; se emplea el obtenido de cobayos por ser el de mejor título y el que presenta menos variaciones de un individuo a otro.

Glóbulos rojos

Durante todo el trabajo se usaron glóbulos rojos de cordero lavados. Para las inoculaciones se empleó una suspensión de estos glóbulos a diversas concentraciones, y para las reacciones de Fijación de Complemento se empleó una suspensión standarizada en el espectrofotómetro (tipo Colleman junior) a 545 Amstrongs, con una concentración tal que 0.4 c. c. de ella en 1.6 c. c. de agua destilada produjeran una solución de hemoglobina cuya densidad óptica fuera de 0.66. En esta forma la suspensión de glóbulos rojos, contenía aproximadamente 5.000 glóbulos por centímetro cúbico, y era igual a través de todas las pruebas.

En la producción de Hemolisina o amboceptor hemolítico, como en la

de todos los sueros inmunes e hiperinmunes empleados en reacciones serológicas e inmunológicas, son muchos los métodos descritos y varios los resultados obtenidos. Es bien sabido que el éxito de una reacción serológica depende de la potencia de los elementos en ella empleados y cuyas características son estables y fáciles de valorar en cualquier momento. Uno de los elementos de capital importancia en la reacción de Fijación de Complemento es el amboceptor hemolítico. En vista de la gran cantidad de métodos empleados para su producción, la diversidad de resultados obtenidos en el hecho frecuente de obtener títulos bajos, se resolvió realizar un trabajo que permitiera establecer cuál de las técnicas señaladas ofrecía más garantías en la producción de Hemolisinas en igualdad de condiciones.

Los resultados obtenidos, como se dijo anteriormente, no fueron tan concluyentes como se esperaba por las causas anotadas. Al conocer estos resultados se pensó que las muestras podrían ser condiciones adversas, difíciles de superar en algunos casos; y por lo tanto, se trató de buscar el método, o los métodos que dentro de esas condiciones dieran mejores resultados para obtener Hemolisinas cuyo título permitiera que ellas fueran empleadas en la reacción de Fijación de Complemento.

Los resultados obtenidos en experiencias preliminares con sueros para el diagnóstico de la Fiebre Aftosa en mayo de 1954 (1). El resumen del trabajo presentado por el doctor Antonio Luis Gualdieri en el Segundo Congreso Panamericano de Medicina Vete-

rinaria (2) (*) cuyo texto fue imposible obtener del autor y el fenómeno observado cuando se emplea la congelación para preservar los sueros, como en nuestro caso, de que al suceder las congelaciones y descongelaciones accidentales se manifiesta una tendencia a la separación de dos porciones del suero, una oscura que se localiza en la parte inferior, y una más clara que ocupa la parte superior, dió origen a la idea de llevar a cabo un experimento tendiente a demostrar la bondad o ineficacia de la concentración de Hemolisinas por el procedimiento de congelaciones y descongelaciones sucesivas sin agitaciones intermedias.

El fenómeno de la concentración se basa fundamentalmente en la crioscopia. El suero sanguíneo de los animales tiene entre otros componentes: albúminas, globulinas, fermentos lipolíticos, fibrinógeno, sustancias nitrogenadas no proteicas y grasas neutras suspendidas en solución acuosa de sales inorgánicas (cloruros, bicarbonatos, etc.), y otros componentes orgánicos. Puede decirse, a grandes rasgos, que en el presente caso se hallan presentes: una porción acuosa y otra porción albuminosa proteica. El punto crioscópico de la primera es más alto que el de la segunda y por lo tanto, al descender la temperatura se produce primero su congelación.

(*) «Se describe un método de concentración de sueros antiaftosos hiperinmunes y convalecientes de cobayo de título bajo.

Mediante congelaciones lentas y repetidas, sin sacudimiento intermedio se obtiene el material concentrado.

La utilización de los sueros concentrados en la técnica de Fijación de Complemento, permite observar valores de titulación de hasta cinco veces el del suero total original».

Al congelarse la porción acuosa pier- de densidad y se dirige hacia la su- perficie de la porción líquida restan- te. Al continuar el descenso de la tem- peratura se produce la congelación total de la masa. Al producirse el fe- nómeno contrario la elevación de la temperatura, se descongela primero aquel cuerpo cuyo punto crioscópico sea más bajo, es decir, la porción proteica, aumentando su densidad en re- lación con la parte acuosa congela- da, lo que acentúa su separación. Al continuar este proceso llegará un momento en que la separación de los dos cuerpos es casi perfecta.

III — Materiales y métodos

a) Materiales.

Baño María a 37° C. para la incu- bación de las reacciones y baño sero- lógico a 56° C. para inactivación.

Gradillas metálicas para 20 tubos.

Pipetas taradas de 1 c. c. gradua- das en centésimos, pipetas taradas de 5 c. c. graduadas en décimos y pipe- tas de 10 c. c. graduadas en décimas.

Vénulas estériles para recoger la sangre; jeringas de 30 c. c. con agujas N° 18 para sangría, jeringas de 10 c. c. con agujas N° 22 para las inocula- ciones.

Centrífuga eléctrica de alta veloci- dad, reloj de laboratorio, nevera de 2° C., congelador de -15° a -20° C.

Tubos de Wasserman, de Kahn y de ensayo corrientes, y en fin, todos los materiales y utensilios de uso co- rriente en un laboratorio.

Glóbulos Rojos: Para la obtención de los glóbulos rojos lavados se san- gra un carnero asépticamente de la vena yugular, recogiendo la sangre

en un Erlenmeyer con perlas de vi- drio, previamente esterilizado y agita- do durante 10 a 15 minutos; se re- parte luego la sangre en tubos de centrífuga estériles y se centrifuga a 1.500 revoluciones por minuto duran- te 15 minutos, botando luego el so- brenadante; se agrega luego solución salina isotónica estéril y se agita has- ta homogenizar la suspensión; se cen- trifuga nuevamente y se repite la ope- ración por cuatro a cinco veces. Des- pués del último lavado se retira el so- brenadante, se suspenden los glóbulos en igual cantidad de solución sa- lina estéril y se conservan en nevera de 3° a 5° C. Esta suspensión stock es empleada para las distintas dilucio- nes a inocular, y para la preparación de la suspensión standarizada usada en las reacciones. Si se trabaja con las debidas precauciones de esterili- dad, la suspensión stock puede con- servarse hasta por seis días.

Complemento:

El complemento empleado en to- das las pruebas estaba constituido por una mezcla de suero sanguíneo obte- nido de varios cobayos normales. El complemento era obtenido por pun- ción cardíaca de cobayos machos adultos normales de más de 500 gra- mos de peso. Una vez obtenida la san- gre, ésta se dejaba al medio ambiente durante media a una hora, se des- prendía el coágulo de las paredes del tubo y era centrifugada a 1.500 revo- luciones por minuto durante 15 minu- tos, después de lo cual se separaba el suero del coágulo. Una vez obte- nido el suero se le agregaba el preser- vativo de Witte para evitar la conta- minación y mantener el título

El suero obtenido de cada uno de los cobayos era titulado por separado para descartar aquellos de título bajo y emplear solamente los que demostraban un buen poder hemolítico, con el fin de evitar errores en las reacciones de fijación de Complemento.

Preservativo de Witte:

Está constituido por:

Acido bórico, 2 gramos.

Sulfato de potasio q. p., 5 gramos.

Agua destilada, 50 c. c.

El preservativo se añade al complemento a partes iguales.

Solución salina isotónica:

Se empleó en todos los casos una solución preparada diluyendo 8.5 gramos de cloruro de sodio químicamente puro en 1.000 c. c. de agua destilada. La solución empleada para la preparación de las suspensiones de glóbulos rojos a inocular era esterilizada en todos los casos. En las reacciones serológicas no se empleó solución salina estéril.

Métodos de producción de hemolisinas

De los diversos métodos de producción de Hemolisinas, los más empleados son los siguientes:

1º—Se aplican cinco o seis inyecciones de cinco centímetros cúbicos de glóbulos rojos lavados de carnero, en suspensión al 10% con cinco días de intervalo (3).

2º—Se aplican seis inyecciones de glóbulos rojos lavados en suspensión stock, con intervalos de tres a cuatro días, en la siguiente forma: primera

inyección, 2 c. c., segunda inyección, 4 c. c. y de la tercera a la sexta inyección, 5 c. c., todas por vía intravenosa (4).

3º—Se inyecta diariamente un centímetro cúbico de glóbulos rojos lavados en suspensión al 10%, por vía intravenosa, durante veintiuno a veintiocho días (5).

4º—Se inyectan por vía intravenosa, dos veces a la semana, durante cinco semanas, 10 c. c. de glóbulos rojos lavados en suspensión al 1% (6).

5º—Se inocula por vía intravenosa un centímetro cúbico de glóbulos rojos lavados cada tres días, por cuatro veces, y se hace sangría de prueba al quinto día después de la última inyección (7).

6º—Se hacen tres inoculaciones por vía intravenosa, la primera de 1 c. c. y las dos restantes de 2 c. c. de glóbulos rojos en tres días consecutivos, repitiendo la serie después de cinco días (8).

7º—Empleando una suspensión de glóbulos rojos al 50%, se inocula una serie de inyecciones con tres días de intervalo, comenzando con 0.25 c. c. y aumentando cada vez más la dosis en 0.25 c. c. hasta completar de cuatro a ocho inyecciones (9).

8º—Se inocula 0.1 c. c. de glóbulos rojos lavados diariamente durante varias semanas (10).

9º—Se inoculan 5 c. c. de glóbulos rojos lavados en suspensión al 10% cada tres días hasta completar cuatro a seis inyecciones.

Casi todos los autores recomiendan sangrar de cuatro a nueve días después de la última inyección, cuando las titulaciones preliminares de los sueros obtenidos de sangría por la

vena de la oreja han dado títulos satisfactorios. El tiempo más adecuado para sangrar es alrededor del séptimo día después de la última inyección.

En todos los casos la sangría final se hace por punción cardíaca en condiciones rigurosas de asepsia.

Después de separado el suero del coágulo, se inactiva a 56° C. durante media hora para destruir el complemento, y se le añade como preservativo una novena parte de su volumen de una solución acuosa de ácido fénico al 5%, de manera tal que éste queda a una concentración final de 0.5%.

Titulación de las Hemolisinas

Se empleó, como para todas las pruebas de Fijación de Complemento, la técnica del doctor Erich Traub.

En cuatro series de tubos de Wasserman, partiendo de diluciones iniciales de 1: 100, 1: 125, 1: 150 y 1: 175, se hacen diluciones progresivas (factor de progresión 2) en tal forma que se obtiene en la primera serie diluciones de 1: 200, 1: 400, 1: 800, etc. En la segunda serie se obtienen diluciones de: 1: 250, 1: 500, 1: 1.000, etc., y así sucesivamente. Para cada uno de los elementos que intervienen en la prueba se emplea un volumen de 0.50 c. c.

Una vez hechas las diluciones de la Hemolisina, se agrega a cada tubo un c. c. de solución salina, la que reemplaza los 0.5 c. c. de antígeno y los 0.5 c. c. de suero específico. Se añade luego en cada tubo 0.5 c. c. de una dilución de complemento al 10%, y por último se agregan 0.50 c. c. de la suspensión de glóbulos rojos lavados de cordero standarizados.

Se agitan los tubos y se incuban en el Baño María durante 15 minutos a 37° C., después de lo cual se hace la lectura.

La apreciación de la intensidad de la hemólisis se hace al ojo, considerándose la hemólisis total como negativo (—) y dándole a la ausencia total de hemólisis el valor de cuatro cruces (++++). Entre estos dos puntos extremos se observan lecturas intermedias, que se pueden valorar de acuerdo con su intensidad en: trazas (tr), media cruz (-r), una cruz (+), una cruz y media (+r), dos cruces (++), dos y media cruces (++r), tres cruces (+++) y tres y media cruces (+++r).

Para una apreciación más exacta de la intensidad de la hemólisis, se centrifugan los tubos después de la reacción a 1.000 revoluciones por minuto durante cinco a diez minutos, estimando el valor de la hemólisis de acuerdo con la cantidad de sedimento globular y el color del líquido sobrenadante.

Se llama título de una Hemolisina a la mínima cantidad de ésta, (o a su más alta dilución) que es capaz, en presencia de una cantidad suficiente de complemento, de producir la lisis total de igual volumen de la suspensión standard de glóbulos rojos.

Titulación del complemento

Se llama título del complemento al mínimo de porcentaje que en presencia de cantidad suficiente de Hemolisina, es capaz de producir la lisis total de igual volumen de suspensión standard de glóbulos rojos.

En una serie de tubos de Wasserman se colocan 0.5 c. c. de comple-

mento en diluciones del 1 al 6% y se añade luego 1 c. c. de solución salina isotónica, (0.5 c. c. que reemplazan al antígeno y 0.5 c. c. al suero específico). Se agrega a cada tubo 1 c. c. de sistema hemolítico (glóbulos rojos sensibilizados), se agitan los tubos y se colocan al Baño María durante quince minutos a 37° C. La valoración de la intensidad de la hemólisis se hace en la misma forma que para las pruebas de titulación de Hemolisina.

El sistema hemolítico está formado por una mezcla a partes iguales de la suspensión standard de glóbulos rojos y una dilución de Hemolisina en solución salina isotónica que contiene cuatro veces su título. Es decir, si el título de la Hemolisina es 1: 4.800, se hace una dilución al 1: 1.200.

IV — Parte experimental

a) Producción de Hemolisinas.

Aunque el deseo era emplear todos los métodos aquí descritos, las limitaciones ya anotadas redujeron esta parte del trabajo al estudio comparativo de los cuatro primeros métodos descritos en el capítulo anterior. Los 24 conejos de que se dispuso para la realización de este trabajo fueron pesados, numerados en la oreja derecha y repartidos en cuatro grupos teniendo en cuenta su peso individual, el sexo y el peso total del grupo, para eliminar en lo posible la interferencia de estos factores. Los cuatro grupos quedaron constituidos en la siguiente forma:

CUADRO I

Anim. No.	Peso gr.	Sexo	Via inoculada	Dosis c. c.	Concentración %	No. inyección	Intervalo días
45	1.300	H	intraven.	5	10	6	5
48	1.270	H	intraven.	5	10	6	5
54	1.450	H	intraven.	5	10	6	5
55	2.250	H	intraven.	5	10	6	5
70	1.160	H	intraven.	5	10	6	5
73	1.300	M	intraven.	5	10	6	5

CUADRO II

Anim. No.	Peso gr.	Sexo	Via inoculada	Dosis c. c.	Concentración %	No. Inyección	Intervalo días
50	1.540	H	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3
51	1.650	M	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3
53	2.100	H	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3
72	1.150	H	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3
74	1.280	H	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3
80	1.230	H	intraven.	2, 4 y 5	10	6	3

CUADRO III

Anim. No.	Peso gr.	Sexo	Via inoculada	Dosis c. c.	Concentración %	No. inyección	Intervalo días
46	1.450	H	intraven.	1	10	23	1
47	1.570	M	intraven.	1	10	23	1
56	1.520	H	intraven.	1	10	23	1
59	1.110	H	intraven.	1	10	23	1
71	2.030	H	intraven.	1	10	23	1
79	1.200	H	intraven.	1	10	23	1

CUADRO IV

Anim. No.	Peso gr.	Sexo	Via inoculada	Dosis c. c.	Concentración %	No. inyección	Intervalo días
49	1.300	H	intraven.	10	4	10	4 y 5
52	1.450	H	intraven.	10	4	10	4 y 5
58	1.780	M	intraven.	10	4	10	4 y 5
75	1.870	H	intraven.	10	4	10	4 y 5
78	1.300	M	intraven.	10	4	10	4 y 5
76	1.280	H	intraven.	10	4	10	4 y 5

Las fechas de inoculación y de sangría de cada uno de los animales de los diferentes grupos, pueden apreciarse en los cuadros V, VI, VII y VIII.

CUADRO V

Inoc. No.	Con. No. 45	Con. No. 48	Con. No. 54	Con. No. 55	Con. No. 70	Con. No. 73
1	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II
2	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II
3	24—II	24—II	24—II	24—II	24—II	24—II
4	1—III	1—III	1—III	1—III	1—III	1—III
5	6—III	6—III	6—III	6—III	(:)	6—III
6	11—III	11—III	11—III	11—III		11—III
Sangría.	18—III	18—III	18—III	18—III		18—III

CUADRO VI

Inoc. No	Con. No. 50	Con. No. 51	Con. No. 53	Con. No. 72	Con. No. 74	Con. No. 80
1	15—II	15—II	15—II	15—II	15—II	15—II
2	17—II	17—II	17—II	17—II	17—II	17—II
3	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II
4	22—II	(:)	22—II	22—II	22—II	22—II
5	24—II		24—II	24—II	24—II	24—II
6	26—II		26—II	26—II	26—II	26—II
Sangría	(::)		7—III	7—III	7—III	7—III

(:) El conejo N° 70 murió el 6 de marzo a consecuencia de shock.

(::) El conejo N° 51 amaneció muerto el 21 de febrero, siendo la causa de la muerte la coccidiosis.

(:::) El conejo N° 50 amaneció muerto el 4 de marzo, siendo la causa de la muerte la coccidiosis.

CUADRO VII

Inoc. No.	Con. No. 46	Con. No. 47	Con. No. 56	Con. No. 71	Con. No. 59	Con. No. 79
1	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II
2	15—II	15—II	15—II	15—II	15—II	15—II
3	16—II	16—II	16—II	16—II	16—II	16—II
4	17—II	17—II	17—II	17—II	17—II	17—II
5	18—II	18—II	18—II	18—II	18—II	18—II
6	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II	19—II
7	20—II	20—II	20—II	20—II	20—II	20—II
8	21—II	21—II	21—II	21—II	21—II	21—II
9	22—II	22—II	22—II	22—II	22—II	22—II
10	23—II	23—II	23—II	23—II	23—II	23—II
11	24—II	24—II	24—II	24—II	24—II	24—II
12	25—II	25—II	25—II	25—II	25—II	25—II
13	26—II	26—II	26—II	26—II	26—II	26—II
14	27—II	27—II	27—II	27—II	(:)	27—II
15	28—II	28—II	28—II	28—II		28—II
16	1—III	1—III	1—III	1—III		1—III
17	2—III	2—III	2—III	2—III		2—III
18	3—III	3—III	3—III	3—III		3—III
19	4—III	4—III	4—III	4—III		4—III
20	5—III	5—III	(:)	5—III		5—III
21	6—III	6—III		6—III		6—III
22	7—III	7—III		(::)		7—III
23	8—III	8—III				8—III
Sangría	15—III	15—III				(:::)

CUADRO VIII

Inoc. No.	Con. No. 49	Con. No. 52	Con. No. 58	Con. No. 75	Con. No. 76	Con. No. 78
1	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II	14—II
2	17—II	17—II	17—II	17—II	17—II	(:::)
3	21—II	21—II	21—II	21—II	21—II	
4	24—II	24—II	24—II	24—II	24—II	
5	28—II	28—II	28—II	28—II	28—II	
6	3—III	3—III	3—III	3—III	3—III	
7	7—III	7—III	7—III	7—III	7—III	
8	10—III	10—III	10—III	10—III	10—III	
9	14—III	14—III	14—III	14—III	14—III	
10	17—III	17—III	17—III	17—III	17—III	
Sangría	24—III	24—III	24—III	24—III	24—III	

(:) El conejo Nº 59 amaneció muerto el 27 de febrero, siendo la causa de la muerte la coccidiosis.

(::) El conejo Nº 56 murió el 5 de marzo por parasitismo.

(:::) El conejo Nº 71 murió el 6 de marzo por parasitismo.

(::::) El conejo Nº 79 murió el nueve de marzo por parasitismo.

(:::::) El conejo Nº 78 amaneció muerto el día 16 de febrero siendo la causa de la muerte, la coccidiosis.

Los conejos fueron sangrados asépticamente por punción cardíaca y la sangre recolectada en tubos de centrifuga estériles. De media a una hora después de la sangría el coágulo era desprendido de la pared del tubo mediante una varilla de madera estéril y el tubo colocada en la nevera durante una hora, para aumentar la contracción del coágulo. La sangre era luego centrifugada a 1.500 revoluciones por minuto durante 15 minutos, después de lo cual era retirado el suero, el cual se sometía nuevamente a centrifugación cuando tenía glóbulos en suspensión. Una vez obtenido el suero en esta forma, era inactivado a 56° C. durante media hora para destruir el complemento, después de lo cual se le añadía una cantidad de una solución de fenol al 5%, de modo que éste que-

dara a una concentración final de 0.5%.

No se realizaron sangrías preliminares, puesto que se trataba de observar los títulos obtenidos con el número de inoculaciones recomendado en cada método, sin exceder las dosis de hiperinmunización.

Una vez obtenidas todas las Hemolisinas, se procedió a su titulación preliminar.

b) **Prueba preliminar.**

Para estas titulaciones solo se emplearon dos series de diluciones: 1: 200, 1: 400, etc., hasta 1: 12.800 y la otra serie 1: 300, 1: 600, etc., hasta 1: 19.200. Los resultados obtenidos pueden observarse en los cuadros IX, X, XI y XII.

CUADRO - IX -

	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:1200	1:1600	1:2400	1:3200	1:4800	1:6400	1:9600	1:12800	1:19200
# 45	-	-	-	-	-	-	-	t	r	+	+	+++	+++	+++
# 48	-	-	-	-	-	-	-	-	t	+	+	+	+++	+++
# 54	-	-	-	-	-	-	-	-	r	+	+	+	+	+++
# 55	-	-	-	-	-	t	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
# 73	-	-	-	t	r	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++

CUADRO - X -

	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:1200	1:1600	1:2400	1:3200	1:4800	1:6400	1:9600	1:12800	1:19200
# 53	-	-	-	-	-	r	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
# 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	r	+	+	+++
# 74	-	-	-	-	-	-	-	t	r	+	+	+	+	+++
# 80	-	-	-	-	-	-	-	-	t	r	+	+	+++	+++

CUADRO - XI -

	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:1200	1:1600	1:2400	1:3200	1:4800	1:6400	1:9600	1:12800	1:19200
# 46	-	-	-	-	-	-	-	t	+	+	+++	+++	+++	+++
# 47	-	-	-	-	-	-	t	r	+	+	+++	+++	+++	+++

CUADRO - XII -

	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:1200	1:1600	1:2400	1:3200	1:4800	1:6400	1:9600	1:12800	1:19200
# 49	-	-	-	-	-	-	-	-	r	+	+	+	+	+++
# 52	-	-	-	-	t	r	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
# 58	-	-	-	-	-	-	-	t	+	+	+	+	+	+++
# 75	-	-	r	r	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
# 76	-	-	-	-	-	-	t	r	+	+	+	+	+	+++

Al observar los cuadros anteriores encontramos que los títulos para las Hemolisinas obtenidas en el primer grupo fueron:

Nº 45: 1: 1.600.

Nº 48: 1: 2.400.

Nº 54: 1: 2.400.

Nº 55: 1: 800.

Nº 73: 1: 400.

Para las Hemolisinas obtenidas en el segundo grupo:

Nº 53: 1: 800.

Nº 72: 1: 3.200.

Nº 74: 1: 1.600.

Nº 80: 1: 2.400.

Para las Hemolisinas obtenidas en el tercer grupo:

Nº 46: 1: 1.600.

Nº 47: 1: 1.200.

Para las Hemolisinas obtenidas en el cuarto grupo:

Nº 49: 1: 2.400.

Nº 52: 1: 600.

Nº 58: 1: 1.600.

Nº 75: 1: 300.

Nº 76: 1: 1.200.

c) **Concentración.**

Basados en los resultados descritos en el segundo capítulo de este trabajo y en las observaciones allí anotadas, se procedió a la concentración de las Hemolisinas con el fin de observar la elevación de su título. El procedimiento desarrollado fue el siguiente:

Las Hemolisinas fueron distribuidas en tubos Pyrex de 100 mm. por 14 mm. en cantidades aproximadas de 8 c. c. y colocados en la nevera (1º a 3º C.)

durante dos horas, después de lo cual eran pasados al congelador de -15° a -20° C. durante un tiempo aproximado de 17 horas (durante la noche). Al día siguiente se sacaban del congelador y se dejaban al medio ambiente (12° a 16° C.) durante aproximadamente 5 horas, mientras se descongelaban, y luego, evitando en lo posible la más mínima agitación, se repetía el proceso por ocho veces consecutivas.

Los detalles del procedimiento empleado, duración, temperatura, etc., pueden observarse en el cuadro XIII.

Una vez lograda la separación de la porción acuosa clara y la porción oscura albuminosa, se procedió por medio de la aspiración con una pera de caucho adaptada a una pipeta (estéril), a separar la porción sobrenadante que fue envasada en otros tubos.

Tanto el sedimento como el sobrenadante fueron conservados en nevera hasta el momento de la titulación.

En todos los casos, de cada una de las Hemolisinas se conservó, sin someter a concentración, una cierta cantidad para ser retitulada posteriormente, en prueba simultánea con el sedimento y el sobrenadante correspondiente.

En el cuadro XIV puede observarse la cantidad total de Hemolisina distribuida en cada tubo, y el volumen de sedimento y de sobrenadante obtenidos después de la concentración, con el porcentaje de sedimento obtenido de cada Hemolisina.

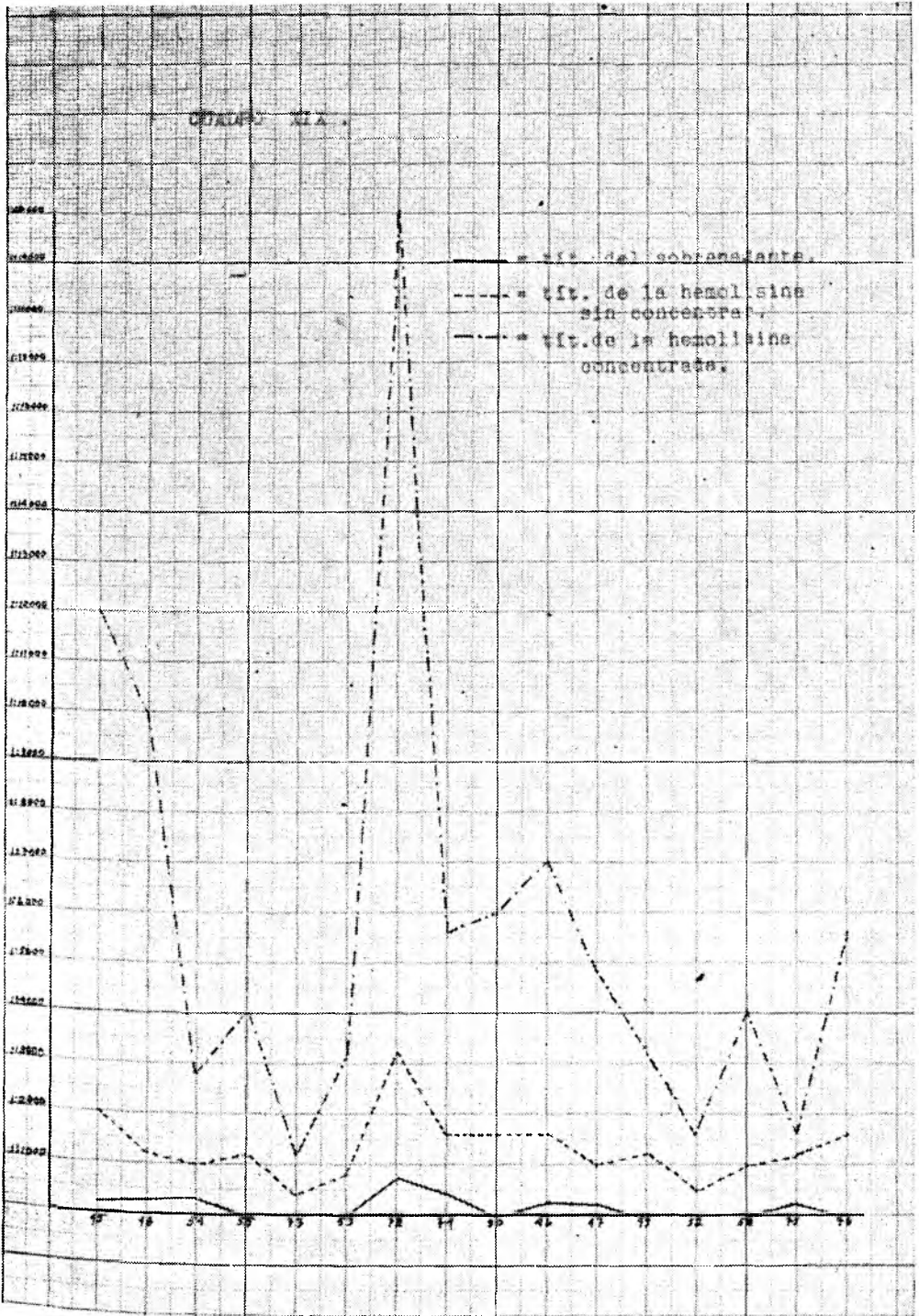
Una vez obtenidos los sedimentos y sobrenadantes de todas las Hemolisinas, se procedió a su titulación, realizando cada vez una prueba en la cual era valorada, en idénticas condicio-

CUADRO XIII

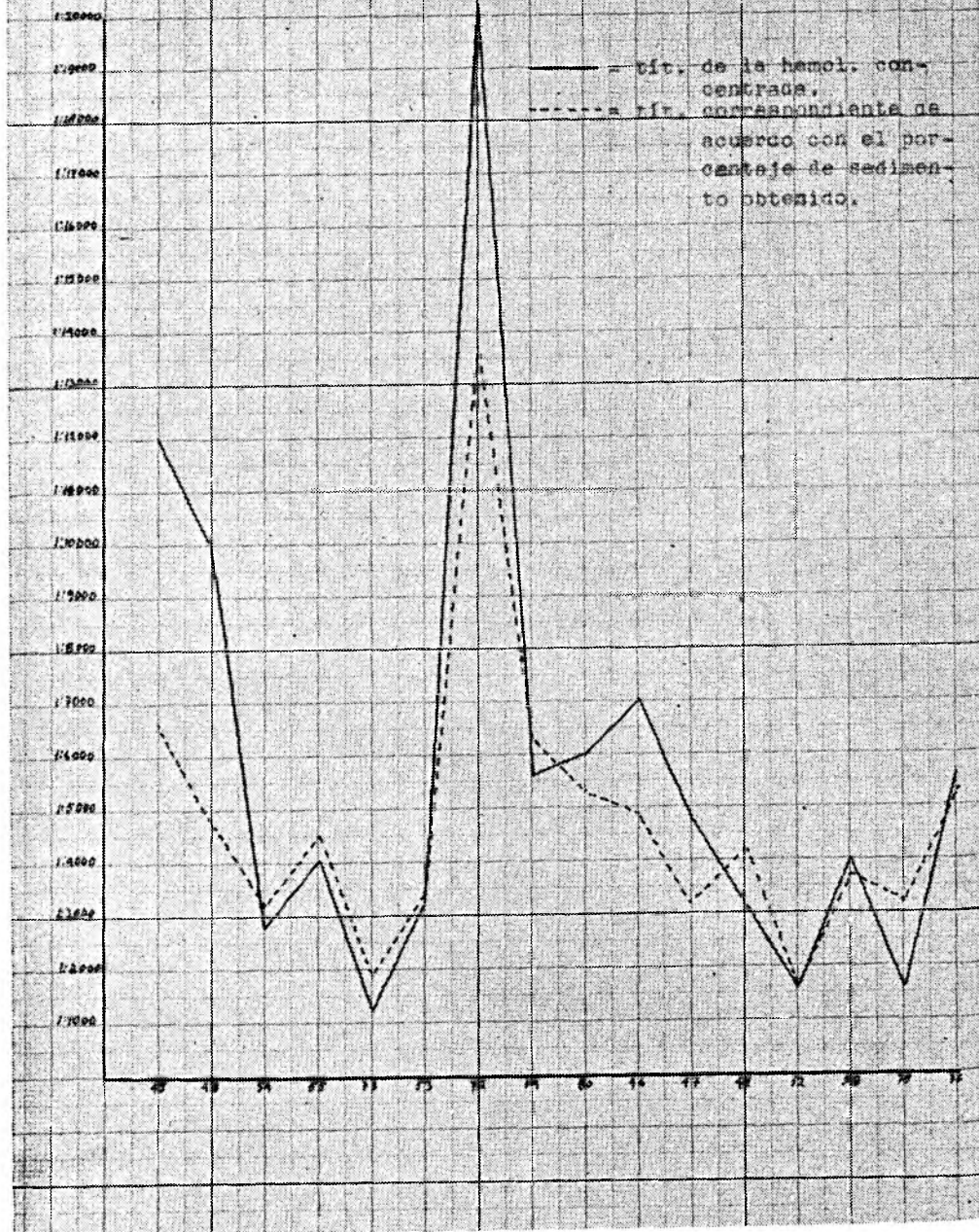
Entrada No.	Fecha	Nevera (hora) p. m.	Temp.	Coagel. (hora) p. m.	Temp.	Salida No.	Fecha	(Hora) a. m.	Temp.
1	19—IV	3	1° C.	5	—10° C.	1	20—IV	9	—18° C.
2	20—IV	1	1° C.	3	— 5° C.	2	21—IV	9	—20° C.
3	21—IV	2	1° C.	4	—15° C.	3	22—IV	9	—20° C.
4	22—IV	2	1° C.	4	—10° C.	4	25—IV	9	—20° C.
5	25—IV	2	1° C.	4	—10° C.	5	26—IV	9	—20° C.
6	26—IV	2	1° C.	4	—15° C.	6	27—IV	9	—20° C.
7	27—IV	2	0° C.	4	—10° C.	7	28—IV	9	—20° C.
8	28—IV	2	1° C.	4	—15° C.	8	29—IV	9	—20° C.

CUADRO XIV

Hemol. No.	Tubo No.	Cantidad total c. c.	Sedimento c. c.	Sobrenad. c. c.	Porcentaje %	Hemol. No.	Tubo No.	Cantidad total c. c.	Sedimento c. c.	Sobrenad. c. c.	Porcentaje %
45	1	8.5	2.5	6	30.43	46	1	8	2.5	5.5	
45	2	8	2.5	5.5		46	2	8	2.5	5.5	32.26
48	1	8	2	6	25	46	3	8	2.5	5.5	
48	2	8	2	6		46	4	8.5	3	5.5	
54	1	8	2.5	5.5		47	1	8	2.5	5.5	
54	2	8	2.5	5.5	31.25	47	2	8	2.5	5.5	31.25
54	3	8	2.5	5.5		47	3	8	2.5	5.5	
54	4	8	2.5	5.5		49	1	9	2.5	6.5	
55	1	8	2	6		49	2	8	2.5	5.5	
55	2	8	2	6	26.47	49	3	8.5	2.5	6	28.26
55	3	8.5	2.5	6		49	4	8.5	2.5	6	
73	1	8.5	2	6.5	20.85	52	1	8	2.5	5.5	
73	2	5.5	1	4.5		52	2	8	2.5	5.5	31.25
53	1	8.5	2	6.5	23.52	52	3	8	2.5	5.5	
53	2	8.5	2	6.5		58	1	9	2.5	6.5	
72	1	8	2	6		58	2	9	2.5	6.5	25.92
72	2	8	2	6	23.33	58	3	8	2	6	
72	3	7.5	1.5	6		75	1	8	3	5	37.50
74	1	6.5	1.5	5	25.42	75	2	8	3	5	
74	2	9.5	2.5	6		76	1	8.5	2.5	6	29.41
80	1	7.5	2	5.5							
80	2	8	2.5	5.5	30.10						
80	3	8	2.5	5.5							



CUADRO XX.



nes, la Hemolisina sin concentrar, el sedimento y el sobrenadante. Para estas titulaciones se emplearon las cuatro series de diluciones α que se hizo referencia en el capítulo tercero de este trabajo, diluyendo la Hemolisina hasta encontrar el punto final. Los resultados obtenidos de estas titulaciones aparecen en los cuadros XV, XVI, XVII y XVIII.

En la gráfica del cuadro XIX aparecen los tres valores obtenidos en la titulación de cada una de las Hemolisinas.

En el cuadro XX pueden observarse gráficamente las diferencias entre los resultados obtenidos con las Hemolisinas concentradas y el título que a cada una correspondería de acuerdo con el porcentaje de sedimento obtenido de ellas y su título antes de la concentración. (Ver cuadro XX).

Al estudiar el cuadro anterior puede observarse que exceptuando los casos de las Hemolisinas números 45, 48 y 72, cuya explicación es aún desconocida, ambos resultados coinciden entre sí, presentándose diferencias que pueden explicarse por la índole de la prueba, la mayor o menor perfección en la separación del sedimento y del sobrenadante, etc.

Resumen

1º—Se ha llevado a cabo un trabajo sobre comparación de métodos para la producción de Hemolisinas, con el fin de determinar cuál de ellos ofrece más garantías en la práctica.

2º—Se describe una técnica para la titulación de estas Hemolisinas.

3º—Se describe una técnica para concentrar Hemolisinas empleando

congelaciones y descongelaciones sucesivas.

Conclusiones

1ª—De los cuatro procedimientos empleados en la producción de Hemolisinas en este trabajo comparativo, ninguno muestra en forma marcada ser más ventajoso que los demás, aunque con el método de la aplicación de seis inyecciones de glóbulos rojos lavados en suspensión al 10% con intervalos de tres a cuatro días, inoculando en la primera inyección 2 c. c., en la segunda 4 c. c. y en las cuatro restantes 5 c. c., todas por vía endovenosa, se obtienen resultados algo superiores.

2ª—Mediante la técnica de congelaciones y descongelaciones descrita, se puede concentrar Hemolisinas con buenos resultados.

3ª—El título de la Hemolisina concentrada por este procedimiento (sedimento), es alrededor de cuatro veces el título de la Hemolisina total antes de la concentración.

Bibliografía

1. **Dr. Enrique Heinsohn de B.**—Estudio preliminar sobre concentración de sueros para el diagnóstico de la Fiebre Aftosa, Revista Ganadería, Órgano de la Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios, noviembre de 1955.
2. **Dr. Antonio Luis Gualdieri**—Concentración de sueros antiaftosos de cobayo. Resumen de los trabajos presentados en el II Congreso Panamericano de Médicos Veterinarios. Sao Paulo, Brazil, 1954.

3. **Kolmer y Boerner**—Métodos de Laboratorio Clínico.
4. **Dr. Erich Traub**—Identificación de virus y tipo por medio de la Fijación de Complemento en enfermedades vesiculares de virus (Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular), 1951. Sin publicar.
5. **Dr. Enrique Heinsohn de B.**—Comunicación personal.
6. **Dr. Enrique Heinsohn de B.**—Comunicación personal.
7. Neill, Hygienic Laboratory.
8. Neill, Higienic Laboratory.
9. **Schweitzer y Stevens**—New York Dptment. of Health Laboratories.
10. Coca. Citado por John A. Kolmer en A Practical Text Book of Infection, Immunity and Biological Therapy. 1924.

C A N J E :

Solicitamos canje.

Solicitiamo il intercambio.

Pede-se intercambio de publicacoes.

We solicit exchange of scientific publications.

Wir bitten um Austausch wissenschaftlicher Arbeiten.

On demande l'échange des publications scientifiques.



Revista de la

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

Apartado 3161 — Bogotá, Colombia.