

PRECIPITINAS Y ANAFILAXIA  
EN LA DIFERENCIACIÓN DE ALBÚMINAS  
SÉRICAS Y MUSCULARES

por

C. LÓPEZ, P. GONZÁLEZ Y I. GUERRICABEITIA

CONSIDERACIONES GENERALES

No hemos de detenernos en razonar la importancia de las reacciones biológicas en la diferenciación de albúminas; tema suficientemente debatido. Pero, a pesar de ello, en la inspección de carnes de nuestro país nada de importancia se ha hecho, con todo e interesar grandemente a los técnicos por su reputación, y al público, para evitar engaños. Queriendo nosotros llenar este vacío, hemos intentado un extenso trabajo y sus primeros frutos son los que hoy aportamos a esta Sociedad.

Antes de pasar a relatarles, aunque sólo sea como recordatorio, estamos obligados a unas consideraciones generales, que expondremos en resumen para no pecar de molestos cuando, como sucede en este caso, se trata de cuestiones conocidas.

Dos años después de haber observado Kraus (1897) la precipitación de los filtrados de cultivos por el suero anti correspondiente, descubriendo las precipitinas que luego, y para mayor claridad, hemos calificado de bacte-

Con estos antecedentes nos parece tener suficiente para la recta interpretación y comprensión de nuestros trabajos.

ANTÍGENOS MÁS EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE SUEROS PRECIPITANTES CONTRA ALBÚMINAS SÉRICAS Y MUSCULARES.

Es ésta, sin duda alguna, una de las cuestiones más interesantes, tanto desde el punto de vista de la obtención de sueros de gran valor, especificidad de los mismos y su utilización para ciertas clases de carnes, como teniendo presente la parte práctica, que no puede olvidarse, sobre todo en la inspección veterinaria.

Para obtener sueros precipitantes contra la albúmina del suero, no es necesario recurrir a otro material que al mismo suero de la especie animal contra la que se quiere preparar, bien separado del coágulo, bien inoculando la sangre directamente. Este precipitógeno se nos revela de los mejores y es de fácil adquisición y conservación aun sin necesidad de adicionarle substancias conservadoras. (Nuttal y Smith han podido inmunizar conejos con suero conservado más de dos años con adición de cresol.)

El método que pudiéramos llamar clásico consiste en practicar tres o cuatro inoculaciones de un c. c. de suero o de líquido que contenga el precipitógeno: si se trata de diferenciar sangres, líquidos orgánicos, pleuríticos o peritoneales, pueden servir también, mientras en el caso de la albúmina de huevo, leche, etc., a ellos hay que dirigirse. Además de éste, puede recurrirse a la inyección subcutánea; en el conejo, cinco a seis veces con cinco a siete días de intervalo, de 9 a 10 c. c. de sangre: al método de Stern inoculando diariamente sangre humana, por espacio de seis días, o al de Fernet y Müller, método intensivo

que luego diremos en qué consiste. De todos modos, con el método seguido por nosotros se obtienen inmejorables resultados.

Si nos concretamos a la cuestión de la diferenciación de carnes, que es el objeto principal de este trabajo, no siempre dan resultados claramente definidos; y si utilizamos como antígeno la misma carne cruda, los resultados no son convincentes cuando se trata de precipitar extractos de las mismas, sometidas, intencionada o casualmente, a manipulaciones o tratamientos; por ejemplo: la acción del calor, que enmascaran, por decirlo así, los efectos del suero.

Por estas razones y otras indicadas en el apartado anterior, los investigadores se han esforzado en preparar un antígeno capaz de provocar la formación de un suero, pudiendo actuar contra unas y otras carnes. Veamos ahora y antes de exponer nuestros trabajos, aunque sea sólo a título de información, el resumen siguiente de los verificados por algunos investigadores y con los resultados parciales o completos que nos son conocidos.

Los primeros estudios de Bordet, Thistowitch y Wolf no sólo les demostraron que los glóbulos rojos no servían para la inmunización, sino que el suero y plasma, sin necesidad de preparación alguna, constituían el elemento fundamental, no dándoseles mejores los tratados con el fin de obtener albúmina purificada.

Miessner, Herbst, Kaster y Wolf, Vallée y Nicolas, siguiendo el orden marcado en la gran obra de Farreras y Sanz Egaña, preconizaron el empleo del suero calentado a 55° como precipitógeno. Pero seguramente hubo de sucederles lo que nosotros hemos deducido de nuestros trabajos, y es que los resultados, con respecto particularmente a las albúminas musculares, son inconstantes, por lo cual se imponían nuevos estudios de preparación o selección de antígenos.

parte, a fin de hacer la reacción más sensible, se aumenta la duración de la acción del suero o de la cantidad de albúminas en la solución; 2.º, se procura obtener precipitinas especiales que puedan obrar sobre albúminas calentadas; 3.º, se procura obtener precipitinas especiales, que obran sobre albúminas calentadas, lo mismo que sobre albúminas desnaturalizadas por los álcalis.

Desnaturaliza del modo siguiente: el suero adicionado de un volumen igual de suero fisiológico, se calienta a 70º durante 30 minutos, adicionándole en seguida una solución normal de sosa, en la proporción de 1 : 12 y se vuelve a calentar durante 15 minutos a la misma temperatura.

Sus conclusiones, con referencia a estas precipitinas, que llama de Schmidt, son: 1.ª, que obran sobre su propio antígeno, es decir, sobre el suero que ha sufrido las transformaciones indicadas anteriormente; 2.ª, sobre el suero calentado a 100º; 3.ª, sobre el suero calentado a 100º y disuelto en un álcali relativamente débil; 4.ª, sobre el suero desnaturalizado, y 5.ª, sobre extractos de carne y de diferentes órganos. Para esta reacción se ha tomado, sea extractos ordinarios, sea extraordinarios desnaturalizados por el método de Schmidt, sea extractos alterados por el calentamiento, si bien, en este último caso, la reacción sería menos sensible.

Este primer trabajo de Chaplhw es ya importante, pero encontrando que la especificidad de estas precipitinas contra albúminas desnaturalizadas sería poco marcada y muy débil con albúminas musculares, siguiendo en parte a otros investigadores y en parte, según su criterio, preparó tres clases de extractos, desnaturalizándolos: 1.º, extractos de carne obtenidos por maceración de carne triturada con suero fisiológico; 2.º, extractos de carne obtenidos por maceración de carne triturada con suero

fisiológico adicionado de 0'1 por 100 de carbonato de sosa o de una solución de 0'1 por 100 de sosa, y 3.º, jugo de carne exprimida.

Resultando que el jugo de carne le dió los mejores resultados tanto en sensibilidad como en acción sobre las albúminas musculares.

Hay, pues, en los extractos de carne tratados por álcali y más particularmente en el jugo de carne exprimida, según los resultados que acabamos de exponer, un antígeno aceptable para la preparación de sueros precipitantes contra las albúminas musculares.

#### ANTÍGENOS EMPLEADOS EN NUESTROS TRABAJOS

Teniendo en cuenta todos los trabajos reseñados y sabiendo por otros originales que los conejos resisten fácilmente dosis realmente masivas de suero sanguíneo siempre que sean fuertes y se practiquen con cuidado, nos propusimos, primeramente, obtener sueros precipitantes con albúminas séricas, pero en vez de limitarnos a inyectar 1, 2, etc., c. c., llegar a cifras no igualadas todavía.

Por otra parte, vistos los resultados del método Vila, inyecciones de plasma, y el de Chaplhow con los jugos de carne, decidimos comprobarles, haciendo cuando fuese necesario las oportunas modificaciones. Por último, teniendo en cuenta la gran dificultad de preparación de algunos de los antígenos anotados, nuestro propósito consistió en encontrar uno más sencillo capaz de dar resultados equivalentes en valor y especificidad. Con estos trabajos y los resultados de la anafilaxia, pensábamos llegar a conclusiones importantes en la diferenciación de carnes. Aunque no se han resuelto todos los puntos propuestos, se ha conseguido bastante. Los antígenos pre-

parados y ensayados con miras a los tres fines indicados, fueron los siguientes:

*Antígeno suero sin tratamiento alguno.* El suero recogido asépticamente, intubado sin adición de antiséptico, sin desactivar y conservado en sitio fresco, es el que hemos empleado en la casi totalidad de las pruebas.

*Plasma de caballo,* preparado apenas sin variantes como en el método de Vila.

*Jugo de carne obtenido por prensa.* Carne picada, envuelta en paño limpio y fuerte, es sometida a presión: el jugo recogido en frascos estériles y adicionado o no, según se emplease reciente o conservado unos días, de unas gotas de cloroformo y de una capa protectora de toluol.

Debemos hacer constar que este procedimiento de obtención y conservación no se ha revelado práctico. De un lado resulta difícil obtenerle en buenas condiciones y aun adicionado de cloroformo y toluol, resulta muy tóxico sin duda, al menos en muchos casos, por haberse impurificado o haber sido insuficiente la cantidad de cloroformo o el tiempo de contacto, pues ya otros han afirmado que permaneciendo en su contacto varios días pierden la toxicidad.

*Jugo de carne obtenido por la sal.* Se pensó en este antígeno en vista de los fracasos del método anterior. La carne picada es adicionada de una cantidad, que sólo en un caso hemos fijado (el tercio en peso), de cloruro sódico y dejada en contacto hasta el empleo o unas horas nada más, recogiendo en este caso el jugo y conservándolo aparte sin otro requisito. Constituye este procedimiento una real ventaja, sobre todo para casos, como operando con carne de caballo, que no siempre se dispone de ella ni es fácil procurársela cuando se necesita.

El suero es dializado antes de su empleo con un dia-

lizador (papel pergamino), siendo suficientes ocho horas con corriente continua para que sea poco menos que completo. Cuando se sabe la cantidad de sal incorporada a la carne es suficiente diluir el suero hasta que tenga 2 ó 5 por 100 de sal.

Este antígeno, aunque no ha sido empleado solo en la inmunización, ha intervenido en varias, sin causar accidentes y contribuyendo a dar, en algunos, buenos resultados. No obstante, esperamos en un nuevo trabajo aportar datos más completos. Una variante de este método y que no ha pasado de intento es la precipitación del jugo obtenido, por el subacetato de plomo y regeneración consecutiva por el anhídrido carbónico.

*Método de Fornet y Müller.* Por último, hemos inoculado tres conejos siguiendo este método: cinco, diez y quince c. c. de suero en el peritoneo en tres días seguidos y sangría nueve días después de la última. Este constituye el tercer punto obscuro de la memoria, aunque no tiene importancia por haber obtenido resultados inmejorables también intensivamente inyectando por las venas.

#### *Técnica general de la titulación*

Para la titulación se recogía la sangre de la oreja o se practicaba después de sangría aséptica total por la carótida.

Como antígeno o precipitógeno se recurrió a los sueros, a macerados y a jugos de carne obtenidos por la sal. La técnica general fué la siguiente:

a) Se empezaba por hacer diluciones madres del suero, macerado o jugo y de cada una de ellas se colocaba 1 c. c. en otros tantos tubitos de base cónica o redondeada, agregándose a cada uno la misma cantidad del suero a titular, o bien

b) Se partía de una dilución al  $1 \times 10$  ó  $1 \times 20$ . Un c. c. de esta dilución con otro de suero fisiológico nos daba una nueva doble al uno veinte o uno cuarenta; un c. c. de éstos y otro de suero fisiológico, otra al uno cuarenta o uno ochenta, etc., hasta llegar a emplear 14 o más tubos con una dilución grandísima. A cada tubo se le añadía la misma cantidad de suero precipitante, cantidad que, en general, consistió en dos gotas de una pipeta que daba unas 22 al c. c. y con lo cual nos aproximábamos lo posible a la *décima* de c. c. preconizado por Uhlenhuth. En las primeras precipitaciones notamos ya la conveniencia de adoptar unos signos convencionales para poder dar un valor a la reacción según su intensidad. Por esto, los tubos en que la precipitación era intensa, eran marcados con el signo más (+) tres veces, esto es, + + +; los que les seguían, con dos + +; los más débiles, con uno +, y, por último, aquellos en que existía una precipitación apenas perceptible, con las letras tr (trazas) y con o los negativos.

Aunque estos signos tienen un valor convencional, porque no en todas las reacciones eran idénticos los precipitados marcados con el mismo signo y porque depende mucho del que verifica la lectura, se impusieron como necesarios. En este trabajo los hemos substituído por números — 3, 2, 1 tr., — más fáciles de estampar. Como se verá más adelante, la interpretación de resultado ha procurado hacerse en horas distintas para así llegar a establecer la más conveniente y aquella en que la reacción ha llegado al límite.

Veamos ahora el detalle de nuestros experimentos, con arreglo a los antígenos empleados.



ANTÍGENO PLASMA DE CABALLO. MÉTODO DE MS. VILA  
(Dos conejos)

*Conejo núm. 16.* — Peso: 3,090 grs.

Este conejo es inoculado por la vena marginal en los días 3, 4 y 6, con 60 c. c. de plasma, 20 en cada inoculación.

A los nueve días después de la última inoculación, se sangra y se titula el suero, obteniendo un resultado de escaso valor. A los doce días aumentó considerablemente, dando el siguiente resultado contra suero de caballo y empezando por una dilución al  $1 \times 5$ .

A las dos horas: 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 1 tr.

A las 16 horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3.

Dos días después, es decir, el 14, después de la última inoculación, se le recoge la sangre asépticamente por la carótida, y titulado el suero contra el mismo antígeno que en el caso anterior, con dilución inicial del  $1 \times 5$  da los siguientes resultados:

A los 50 minutos: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 1, 1.

A las dos horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3.

Como por falta de tubos no fué posible alcanzar el límite, se repite la titulación empezando por una dilución al  $1 \times 20$ , y, como en todas, doblando siempre.

A los 50 minutos: 3, 3, 3, 3, 3, 2, tr. tr. 0.

A los 90 minutos: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, t. tr. tr.

A las cinco horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 1, 1, 1,  
1 tr.

A las seis horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 2, 1,  
1 tr.

Esto es *un valor*, no dando como positivo más que el 3 y el 2, de uno por *ochenta* y *un mil* y más.

Comprobado este suero contra sueros de buey y cerdo, ha dado resultados negativos, lo cual es muy interesante. En cambio, puesto en contacto con suero de carnero, a

las 15 horas se ve precipitación débil, 1 en los diez tubos y a igual dilución del cuadro anterior con un coágulo o copo blanquecino en todos ellos.

Como esto no tenía otra explicación que un error de técnica, pues no está registrada la precipitación de grupo entre estos animales, repetimos la operación, partiendo de una dilución al  $1 \times 20$ . Examinada a las 17 horas, por no haber sido posible verificarlo antes, en nueve tubos, únicos empleados, hay una especie de precipitado, en nada comparable, desde el punto de vista de la cantidad, al obtenido contra suero de caballo, pero ahora, en cambio, no hay coágulo o copo en suspensión.

Debemos advertir, por si pudiese explicar, en parte al menos este resultado, que el suero de carnero no fué obtenido en condiciones, pues creyendo el que sangró el animal que era necesario desfibrinar, agitó el frasco con bolitas de vidrio utilizado para la recolección de sangre, algún tiempo, hasta que nos apercebimos, siendo necesario centrifugar fuertemente después para obtener un suero poco límpido y muy hemolizado.

*Conejo núm. 17.* — Peso: 3,150 grs.

Este conejo recibe tres inoculaciones intravenosas de 20 c. c. de plasma cada una, en los días 3, 4 y 6. Titulado su suero diez días después de la última inoculación, dió un resultado poco satisfactorio, al menos dadas nuestras esperanzas. En su vista, se le vuelve a inocular dos días después 3 c. c. de suero de caballo y al día siguiente cinco más.

A los 7 días de esta última inoculación y a los 17 de la última de plasma, se le sangra y examina el suero empezando por una dilución al  $1 \times 20$ , obteniendo el siguiente resultado:

A la media hora: opacidad sin precipitación.

A las 16 horas: 3, 3, 3, 3, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1, tr.

Al día siguiente de esta titulación se le sangra totalmente y una vez libre el suero se le titula partiendo de la misma dilución inicial al  $1 \times 20$ . Resultado: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2 (faltan tubos).

24 horas después: nueva titulación.

A las cinco horas: *precipitación enorme* en los nueve tubos dispuestos.

Examinado este suero, de resultados parecidos, en cuanto al poder, al anterior, contra *suero de buey* es *positivo* el primer tubo y negativos los demás.

Transcurridas 24 horas, la precipitación, limitada al principio al primer tubo, llega a ser de relativa importancia, pues fué señalada con los números: 3, 2, 2, 2, 1 tr.

Desde luego es muy inferior a la obtenida con el antígeno homólogo y más lo hubiera sido interpretada a las cinco horas, cuando la titulación contra suero de caballo había dado precipitación enorme en los nueve tubos dispuestos y la prueba contra suero de buey era negativa o limitada al primer tubo. El tiempo de 24 horas que nosotros hemos esperado en algunas titulaciones es excesivo, y susceptible de interpretaciones equivocadas, máxime si la temperatura del local donde se conservan los tubos no impide la germinación de bacterias que forzosamente han de caer en los tubos durante la operación.

Aunque en este caso no fuese atribuible a esto, queda la explicación de las precipitinas naturales que todo suero contiene, la cantidad de albúmina y la gran potencia del suero precipitante, pues está demostrado que con sueros de alto valor se obtienen, a veces, estas precipitaciones, que nada significan en contra de la especificidad. Por último, una pipeta o tubo mal lavado o cualquier descuido en la técnica, también puede conducirnos a errores.

Contra *jugo de carne* de caballo obtenido por la sal conforme a la técnica indicada, y diluido en la proporción

de 5 de jugo y 95 de agua destilada, dilución que después hemos visto ser excesiva y apenas sin albúmina, da *precipitación* en los dos *tubos primeros*, permaneciendo transparentes los demás. Pensamos que diluyéndole unas cinco veces obtendríamos mayor precipitación, y así resultó. Suero de este conejo contra jugo de carne de caballo obtenido por la sal y diluído al *uno por cinco*:

A las dos horas: 3, 2, 2, 1, 1, 1 tr., tr., tr.

Aceptando como positiva únicamente la marcada con un *uno* (1 × 160), vemos es aceptable, aunque desde luego muy inferior a la de suero, precisamente porque éste tiene unas siete veces más de albúmina y luego por la especificidad.

#### NOTA CURIOSA E INTERESANTE

En la autopsia de este conejo y en la región lumbar se halla una vesícula o quiste del tamaño de un huevo de gallina debida al *Cænurus serialis*, larva de la *Tænia serialis* del perro, vesícula que contiene gran cantidad de líquido y *vesículas hijas* (diferenciación del *Cænurus cerebrealis*). Cada una de estas vesículas había dado nacimiento a *numerosas cabezas de tenia* que, al examen microscópico, estaban compuestas de cuatro *ventosas* y *doble corona* de *ganchos*. En resumen: el conejo este padecía la *Cenurosis* de este animal, localizada esta vez en esta región.

El líquido del quiste no contenía precipitinas contra el suero de caballo. En cambio, precipitaba, aunque no fuertemente, el suero del mismo animal (su mismo suero) (reacción de Weinberg).

#### ANTÍGENO SUERO. — MÉTODO DE FORNET Y MÜLLER (Tres conejos)

Conejo núm. 1. — Peso: 1,700 grs. — Suero caballo.

Conejo núm. 2. — Peso 1,750 grs. — Suero de buey.

*Conejo núm. 3.* — Peso 1,625 grs. — Suero de cerdo.

Estos tres conejos reciben tres inoculaciones: tres días consecutivos de cinco, diez y quince centímetros cúbicos de un suero cada uno en el peritoneo.

Sangrados totalmente doce días después, no pudimos llegar a formarnos idea de este método, ni a obtener resultado alguno, por lo cual será objeto de un segundo trabajo que servirá de complemento a esta memoria.

ANTÍGENOS A BASE DE JUGOS DE CARNE OBTENIDOS  
POR PRESIÓN Y POR LA SAL

*Jugo de carne de caballo.* — (Cuatro conejos)

*Conejo núm. 4.* — Peso: 1,950 grs. — *Método lento.*

Recibe tres inoculaciones intravenosas de jugo obtenido por presión, con cinco y seis días de intervalo entre cada una y en cantidad de *uno, uno y cinco* c. c. de jugo obtenido por sal y *dializado*. Desde la última inoculación hasta la sangría transcurren 15 días: Como antígeno para titular el *suero de caballo*. Resultado, partiendo de una dilución al  $1 \times 10$ : 2, 2, 3, 3, 2, 1, 3, 2, 2, 1, 1.

*Valor*, según técnica general, de *uno por diez mil doscientos cuarenta*.

*Conejo núm. 7.* — Peso: 1,915: Igual tratamiento que el anterior: Partiendo de  $1 \times 20$ ; a las 18 horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2. (Por falta de tubos no se alcanzó el límite. Aceptando éste tendríamos un valor de *uno por cinco mil ciento veinte*.)

*Conejo núm. 6: Inyección intraperitoneal.* — Peso: 1905 gramos. — Recibe dos inyecciones de jugo obtenido por presión en cantidad de 2 y  $1/2$  c. c. cada una, y otras dos con cinco c. c. de jugo obtenido por sal y dializado, cada cinco días.

A los 15 días y contra suero de caballo, partiendo de una dilución al  $1 \times 20$  y a las 18 horas, nos da este resultado, 2, 2, 2, 1, 1, 0, tr. 0, 0, 0.

Valor de *uno por trescientos veinte*.

*Conejo núm. 5.* — Peso: 1,830 grs. — Igual tratamiento que el anterior: Resultado, partiendo de una dilución al  $1 \times 5$ : 2, 2, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 0, 0.

Valor de *uno por mil doscientos ochenta*.

#### JUGO DE CARNE DE VACA

*Conejo núm. 8.* — Peso: 2,150 grs. — *Intravenosa*.

Recibe dos inoculaciones de jugo obtenido por presión y de 2 y  $\frac{1}{2}$  c. c. cada una y otras dos de *cinco* c. c. de jugo obtenido por cal y dializado. Titulado a los diez días, dió el siguiente resultado contra suero de vaca, y partiendo de una dilución al 1 por 100 y a las 17 horas: 3, 3, 3, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1.

Sacrificado dos días después, a las 4 horas y partiendo de una dilución al  $1 \times 20$ , el siguiente y, definitivo resultado: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 1, tr.

Esto es, un valor de *uno por más de cuarenta mil*.

*Conejo núm. 9: Jugo de carne de vaca calentado y crudo.* — Peso: 2,315 grs. — Tratamiento parecido al anterior.

Titulado contra suero de vaca: 3, 3, 3, 2, 1, 0, 0, 0.

Dos días después, sangría y titulación definitiva, partiendo del  $1 \times 10$ : 2, 3, 3, 3, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 1.

Titulación aproximada al *uno por cien mil*, la más elevada obtenida por jugos.

*Nota:* Las pruebas de este método con jugo de vaca se empezaron en seis conejos, pero únicamente los dos apuntados se pudieron utilizar. De los cuatro restantes, dos murieron infectados en la segunda inoculación, cinco días después de la primera y en las 36 horas siguientes a

ella. Otro murió por placa gangrenosa del vientre y el cuarto llegó a un estado de enflaquecimiento que fué desechado sin utilizar. En la autopsia, el hígado de este animal estaba lleno de quistes de coccidias.

Por esta razón seguiremos la numeración correlativa y llegaremos a una reseña de los 31 conejos sometidos a estos ensayos.

JUGO DE CARNE DE CERDO OBTENIDO POR PRESIÓN  
(Dos conejos)

*Conejo núm. 10.* — Peso: 2,205 grs.

Recibe la primera inoculación a 1 c. c. de jugo obtenido calentando la carne en la parrilla y extrayendo luego el jugo: la segunda de un c. c. de jugo fresco y la *tercera* y *cuarta* de cinco c. c. de jugo obtenido por la sal. *Todas intravenenosas.* Titulado contra *suero de cerdo* a los diez días de la última inoculación, partiendo de una dilución al *uno* por *diez* nos da el siguiente resultado *a las 17 horas*: 3, 3, 3, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 0, esto es, un poder de uno por *dos mil quinientos sesenta*. Se le mata a los 18 días después a la última inoculación y titulado contra suero es *casi* negativo. Contra macerado de carne de cerdo partiendo de uno a diez, el día 16 de la última inoculación nos dió este resultado: 2, 1, tr.; tr. total: un valor de uno veinte a uno ochenta. A los diez y ocho días, da *trazas* de precipitación en los cinco primeros tubos y nada en el resto.

La historia de este conejo, tal como queda expuesta, muestra claramente el hecho de la desaparición relativamente pronta de las precipitinas, pues si a los diez días podía considerarse su suero como de cierto valor, a los 18 casi habíen desaparecido por completo. Contra macerado fué positivo a los diez y seis, aunque en débil grado y, en cambio, casi negativo a los diez y ocho y diez y nueve.

No hay que olvidar, estamos en el método lento.

*Conejo núm. 11.* — Peso: 2,126 grs. — Recibe dos inoculaciones intraperitoneales de 2 y  $\frac{1}{2}$  c. c. cada una de jugo fresco y dos más de 5 c. c. venosas, de jugo obtenido por la sal y dializado.

Titulado a los diez días contra *suero* de cerdo, partiendo de una dilución al uno por diez, da el siguiente resultado definitivo: 3, 2, 2, 2, 2, 2, 1, 0, 0, esto es, una valoración a uno por *seiscientos cuarenta*, titulado también a los diez días contra macerado de carne de cerdo, partiendo también del uno diez, da este resultado a las 17 horas: 3, 2, 1. tr. 0, 0 uno por cuarenta.

Sacrificado ocho días después, décimotercero de la última inoculación y titulado contra *suero* y macerado, el resultado fué *negativo*.

#### ANTÍGENO SUERO DE CABALLO. — MÉTODO RÁPIDO

*Conejo núm. 18.* — Peso: 3,045 grs.

Recibe por la vena marginal tres inoculaciones a 20 c. c. cada una de *suero de caballo*, días 9, 10 y 12.

Titulado a los 11 días, partiendo de una dilución al  $1 \times 20$ , dió este resultado admirable: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 0. A las 16 horas y misma dilución: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 3, 3, 3, 3, 2, esto es, 14 tubos doblando, igual a un poder del *uno por ciento sesenta y tres mil ochocientos cuarenta*.

El mismo *suero* contra *suero* de vaca, a las 19 horas: tr. 2, 2, 0, 2, tr. 0 tr. tr. 0, 0, 0, cuando más un valor de uno por *ochenta* o ciento sesenta.

*Conejo núm. 19.* — Peso: 1,915 grs.

Recibe también por la vena tres inyecciones de a 20 c. c. de *suero de caballo* cada una, días 9, 10 y 12. Se le titula a los 15 días, dando en el acto una precipitación hasta el



tubo sexto, que partiendo de una dilución al  $1 \times 20$  se se eleva a 1,280 a las 18 horas y con la misma dilución 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, tr. tr., esto es, un valor de *uno por veinte mil cuatrocientos ochenta*.

ANTIÉGENO SUERO DE CABALLO.— MÉTODO LENTO-RÁPIDO

*Conejo núm. 20.* — Peso. 1,895 grs.

Dos inoculaciones en los días 9 y 10 a cinco c. c. cada una en las venas, pues estaba destinado a inmunización lenta con doce inoculaciones de a cinco c. c., esto es, una cantidad igual a los anteriores; mas no pudiendo verificarlas por las venas por su mal estado y siendo de temer en las inoculaciones intraperitoneales en marcha lenta las placas gangrenosas, se le hizo una tercera inoculación, nada más, de 20 c. c. peritoneal con la cual recibió 30 c. c. y pasó a ser rápida.

A los 18 días se titula el valor del suero contra suero de caballo y jugo de carne del mismo animal.

Contra suero, dilución inicial de  $1 : 10 =$  a las 22 horas: 1, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 0, 0; total: *uno por dos mil quinientos sesenta* pero no fuerte.

Contra jugo de carne a sal: 2, 1, 0, tr. 0; *uno por veinte*.

*Conejo núm. 21.* — Peso 1,912 grs.

Igual tratamiento que el anterior.

A los 18 días, contra suero de caballo, desde el uno diez:

A la hora: 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 2, 1 tr. tr., 0.

A las 20 horas: 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2. Resultado final: *uno por cuarenta mil novecientos sesenta*.

Contra jugo de carne de caballo obtenido por la sal: a la hora: trazas en los cuatro primeros tubos.

A las 20 horas: 3, 2, 1, tr. 1, tr. 1, tr. 0, 0, 0.

Total: valor real del uno por cuarenta, pero débil-

mente apreciable al uno por trescientos veinte y aun seiscientos cuarenta, si bien es difícil establecer exactamente el valor que concedemos al *uno* y al *trazas*, con todo y crearles necesarios en la literatura.

*Conejo núm. 22.* — Peso: 2,962 grs.

Este conejo recibió también tres inoculaciones intravenosas de suero, 20 c. c. en cada una; pero fué titulado contra suero de caballo y de asno con un gran precipitado. En cambio, tiene poco poder contra macerado de carne de este animal, sin duda como pudimos comprobar, por tener muy poca albúmina.

Contra jugo de carne de caballo obtenido por la sal y contra macerado se mostró igualmente poco potente.

El macerado contenía unas cinco veces menos de albúmina que el suero, y el jugo o sal unas cuatro.

*Conejo núm. 23.* — Anafilaxia provocada.

Recibe tres inoculaciones de a 20 c. c. de suero de caballo los días 9, 10 y 12.

Como durante tres meses de inoculaciones en una treintena de conejos, no habíamos visto morir ni uno solo de anafilaxia, lo cual es explicable por la gran resistencia natural de este animal a ella y por el especial cuidado puesto en las inoculaciones, a los 21 días de la última inoculación del conejo núm. 23, le inyectamos en la vena 20 c. c. del suero correspondiente, obteniendo el choque anafiláctico característico con una carrera loca, parálisis del tercio posterior y muerte en unos tres a cuatro minutos.

Queremos anotar aquí algunas observaciones que pueden desvanecer ligerezas que andan en publicados recientes todavía.

Se ha escrito que en el conejo hay que temer mucho a la anafilaxia, que se presenta en la *segunda inoculación*, aun hecha cinco días después de la primera y que es necesario recurrir a inyecciones antianafilácticas subcutánea-

mente y antes de recurrir en las últimas inoculaciones, a la intravenosa.

Nosotros podemos afirmar que el conejo es animal poco propenso a la anafilaxia, que los muertos en la segunda inoculación (cinco días después de la primera) no mueren de anafilaxia y que son innecesarias las inyecciones antianafilácticas. Se puede inyectar impunemente a un conejo por las venas, doce y más veces seguidas, alternas, con mucha o poca cantidad de suero o plasma, sin temor alguno *con sólo hacer la inoculación muy lentamente*, y nada más lógico teniendo en cuenta la teoría de Turró y González para explicar el mecanismo de la anafilaxia.

Una observación, que tal vez no tenga todo el valor, pero que la hemos observado a veces, es que cuando se inocula (desde luego doce días después de la primera inoculación) y por la vena, si se hace rápidamente, el conejo empieza a mover las mandíbulas como si masticase; pero si se verifica con toda lentitud o nos detenemos en el primer caso, aquellos movimientos y otros extraños que hace el animal no se ven más: no parece sino que ellos son los primeros indicios del estado anafiláctico, lo cual encuentra un apoyo en los síntomas con que se denuncia el choque en el cobayo.

*Conejos núms. 24 y 25.* — Estos han servido como vía de ensayo de un nuevo antígeno:

Reciben por la vena jugo de caballo obtenido por sal, precipitado por el subacetato de plomo y regenerado por el anhídrido carbónico, con intervalos de tres días en cada inyección, 20 c. c. y medio en cinco inyecciones.

Ambos conejos mueren del quinto al décimo día de la última inoculación en un estado de flacura extrema sin poder titular.

Los números 26, 27, 28 y 29 fueron inoculados con jugo de carne obtenido a presión y en cantidad de cinco

centímetros cúbicos cada uno por inyección intravenosa, muriendo en las 48 horas siguientes.

Practicada la autopsia y el examen microscópico, pudo comprobarse la presencia de una infección septicémica, a pesar de haber hecho uso del cloroformo y toluol para conservar y en la forma expuesta anteriormente.

#### ANTÍGENO SUERO. — MÉTODO LENTO

##### Conejos 30 y 31

*Conejo núm. 30* — Peso: 3,005 grs.

Recibe *doce* inoculaciones intravenosas de cinco c. c. cada una los días 9, 10, 12, 13, 17, 21, 22, 23, 26, 27, 28 y 29.

Titulado con suero de caballo, a las veinticuatro horas y partiendo de una dilución al 1 por 100, fué positiva en los siete primeros tubos, por tanto con un poder del *uno* por *seis mil quinientos*.

Titulado contra jugo de carne obtenido por sal diluído al  $1 \times 5$ , llega a dar resultado al *uno* por *ciento sesenta*, pero muy débil.

Sangrado totalmente y titulado contra suero da el siguiente resultado, partiendo de una dilución al 1 por 100.

A las cinco horas: 100, 200, 400 y trazas en 800.

A las veinticuatro: Positivo hasta el *seis mil cuatrocientos*.

*Conejo núm. 31*. — Peso 2,204 grs.

Recibe tres inoculaciones de 20 c. c. cada una en los días 9, 10 y 12 y luego una el 29 de cinco c. c. en el peritoneo como refuerzo.

La titulación se prueba contra suero de caballo partiendo de una dilución al 1 por 100. — A las 24 horas: 100, 200, 400, 800, 1,600 y 3,200.

Contra macerado de carne de caballo, partiendo del *uno cinco*; *positivo* hasta el  $1 \times 40$ , pero débil a partir del  $1 \times 20$ .

Sangrado totalmente y titulado contra suero. Dilución desde el uno por 100:

A las cinco horas: 100, 200, 400, 800,

A las veinticuatro: *Positivo* hasta el *uno por cuatro mil cuatrocientos*.

Probado contra suero de cerdo: A las cinco horas *negativo*.

A las 24 : 2, 2, 2, 1, 1, 0, 0, esto es, al uno por ochenta; mas no puede admitirse la interpretación a tantas horas porque aun con suero heterólogos los más distantes dan precipitados.

Relatada la historia de los 31 conejos sometidos a experimentación veamos de discutir imparcialmente los resultados obtenidos.

### *Discusión*

Un ligero examen de nuestros trabajos nos lleva a formular afirmaciones de cierto valor como contribución al estudio de la diferenciación de albúminas séricas y musculares.

Si les examinamos por antígenos, vemos, por ejemplo, que el antígeno plasma, empleado primeramente por Vila en método lento, en nuestras manos se ha revelado potentísimo con sólo tres inyecciones intravenosas de 20 c. c. cada una, hechas en 3 ó 4 días, y sangría transcurridos 14 desde la última. El suero obtenido es igualmente precipitante contra albúminas musculares homólogas, aunque en muchísimo menos grado, no tan sólo porque la empleada contenía cuatro o cinco veces menos de albúmina que el suero, sino por la menor especificidad.

Sólo una cosa extraña hay que hacer constar, y es la precipitación observada contra el suero de carnero, lo cual bien pudo ser debido a un error técnico, a imperfección en la recogida, lo cual se observó, como hemos dicho, o al extraordinario poder del suero, que ha llegado a sobrepasar al  $1 \times 100,000$ .

Mas es conveniente que las comprobaciones se verifiquen en las primeras seis horas sin esperar a las 24, pues, en ciertos casos, se han obtenido precipitaciones que, sin ser comparables en título y cantidad a las homólogas, podrían en ocasiones hacer menos valioso el método. En concreto: el antígeno plasma por el método intensivo que hemos indicado, es de un gran valor, particularmente para la diferenciación de albúminas séricas.

El método de Fornet y Müller, intensivo también, mas recurriendo a la inoculación intraperitoneal, queda en estudio para un nuevo trabajo. En principio, y teniendo en cuenta que la producción de precipitinas por este método es más local que en el anterior, puede sospecharse no igualará en valor al anterior, aunque tenga en su apoyo los experimentos de Bontroff y Tsuzuki. Sin embargo, cabe preguntar qué resultará por lo que hace referencia a la especificidad.

Para poder contestar únicamente podemos guiarnos por los experimentos de estos investigadores, los que se han decidido por el método de Fornet cuando se le compara con el clásico de inyecciones con seis a siete días de intervalo. Como nuestros trabajos nos han demostrado que el método rápido da resultados excelentes inoculando en las venas, resta únicamente ver si los da superiores el mismo método por inoculación intraperitoneal, lo cual, por la razón indicada, no es probable.

Lo que hemos dicho del antígeno plasma pudiera hacerse extensivo al antígeno suero por método rápido,

lo cual nos parece muy natural. Sesenta c. c. de suero inyectado en tres veces por las venas en tres o cuatro días seguidos y titulado el suero unos once o catorce después de la última inoculación, nos proporciona un suero de valor enorme, pues en un conejo ha llegado a más del *uno por cien mil* y, en otro, *uno por veinte mil*. Las comprobaciones contra sueros heterólogos (buey) nunca pasaron del *uno por ochenta* en el mismo tiempo.

Debemos confesar han faltado pruebas en grande contra albúminas musculares; mas por las hechas tal vez tenemos datos suficientes para un juicio aproximado.

El antígeno suero por método que hemos llamado lento-rápido, practicando dos inoculaciones intravenosas dos días consecutivos, de *cinco* c. c. cada una y una tercera de 20 c. c. intraperitoneal, en un caso se consiguió también un suero de gran valor, *uno* por 40,000, con un valor precipitante contra la albúmina muscular homóloga de *uno* por *cuarenta* al uno por *seiscientos*, aunque muy débiles las superiores al  $1 \times 40$  y a pesar de que contenía 4 a 5 veces menos de albúmina que el suero. El de otro conejo inmunizado intensivamente con suero y titulado contra suero de *burro* y de caballo fué muy potente, pero muy poco con extractos de carne.

En resumen: el método de inmunización intensivo, recurriendo al suero como antígeno, viene a dar resultados parecidos al método intensivo de plasma y, como él, es inmejorable en la obtención rápida de sueros de gran valor y específicos contra la proteína sérica.

El método suero lento-rápido, por no haberse podido cumplir en todas sus partes, sólo permite afirmar se ha revelado de valor con inyecciones venosas y peritoneales combinadas.

Por último, el método lento de doce inoculaciones venosas a *cinco* c. c. cada una, contra lo esperado, y si

bien ha dado un suero aceptable, no tiene, con mucho, el valor precipitante de los obtenidos por método rapidísimo. En cambio, contra albúminas musculares frescas ha dado resultados equivalentes.

Los antígenos a base de jugos de carne, métodos lentos, han dado resultados variables aun para el antígeno correspondiente. Por ejemplo: en los de carne de caballo se han obtenido desde el  $1 \times 320$  al  $1 \times 10,000$ .

Estas variaciones débense, con toda seguridad, a ser titulados en días diferentes y a que no todos los animales se prestan igualmente para la producción, con mayor motivo no habiéndose evitado la toxicidad del antígeno obtenido por la prensa. En cambio, con los jugos de carne de vaca, el resultado ha sido excelente, pues se han obtenido sueros que titulados contra la proteína del suero correspondiente han dado un poder del  $1 \times 40,000$  y del  $1 \times 100,000$ , los de más valor entre los jugos.

Por una circunstancia que no hace al caso, estos dos sueros no pudieron comprobarse contra su mismo antígeno (jugo de carne de vaca), lo cual es causa de que este trabajo deba ser completado con otro que tienda a demostrar el valor del antígeno jugo a presión y jugo a sal en la diferenciación de carnes, incompletamente resuelto aquí, porque las comprobaciones de los sueros contra jugo y suero de cerdos (dos conejos) que pudieron verificarse, fueron hechas después del tiempo en que hemos visto conviene hacerlas sin exponerse a que la cantidad de precipitinas circulantes haya decrecido en bastante proporción.

No obstante, si tomamos la titulación más elevada de los sueros preparados con albúminas séricas, contra jugos y macerados de carne y las dadas por estos conejos inmunizados con albúminas musculares, tenemos que la más elevada en los primeros, plasma, fué del  $1 \times 160$  para el



jugo y más del  $1 \times 100,000$  contra el suero; en las de suero, del  $1 \times 40$  al  $1 \times 600$  débil contra jugo y  $1 \times 40,000$  contra el suero en método rápido, del  $1 \times 40$  contra jugo y  $1 \times 400$  en método lento, no son superiores a las obtenidas con el suero contra jugo de cerdo que fué del  $1 \times 80$  y de este mismo contra suero del mismo animal que llegó al  $1 \times 6,400$ , resultando favorable inclusive la comparación para el jugo cuando de inmunizar conejos para diferenciación de albúminas musculares se trate, con la ventaja de que también por ellos se obtienen buenos sueros contra las albúminas séricas.

Mas, para evitar la toxicidad, puede reemplazarse el antígeno obtenido por la prensa por el obtenido por la sal y el subacetato de plomo.?

Con respecto a éste nada puede decirse. Con referencia a la sal, aunque el trabajo no es completo, no puede negarse que sus resultados han sido buenos en varios conejos en los que se inyectó en más cantidad que el jugo a presión.

De todo lo anotado, ya podemos formularnos algunas conclusiones en espera de nuevos trabajos.

#### CONCLUSIONES

1.<sup>a</sup> Para la diferenciación de albúminas séricas los mejores antígenos están representados por el suero y el plasma sanguíneo.

2.<sup>a</sup> El método que da mejores resultados es el intensivo, esto es, tres inoculaciones intravenosas en tres días seguidos de 20 c. c. cada una y sangría de los doce a los catorce de la última inyección.

3.<sup>a</sup> Los sueros precipitantes preparados por este procedimiento llegan a tener un valor grande, hasta más del uno por cien mil, son específicos cuantitativamente

y precipitan, aunque en grado poco elevado, las proteínas musculares frescas.

4.<sup>a</sup> De los antígenos empleados en la preparación de sueros precipitantes contra albúminas musculares no desnaturalizadas, el jugo obtenido por presión y el jugo obtenido por la sal parecen los preferibles.

5.<sup>a</sup> Con ellos, evitada la toxicidad del primero, pueden obtenerse sueros precipitantes de gran valor contra el suero correspondiente y de un valor proporcional contra los macerados y jugos de carne homóloga. Como los anteriores, son cuantitativamente específicos.

6.<sup>o</sup> El jugo obtenido por sal se revela como un buen antígeno y tal vez ocupa el primer puesto cuando de inmunizar conejos con fines de diferenciación de carnes se trata. Por otra parte, contiene más cantidad de albúmina que los macerados empleados, y dializado puede servir para la titulación.

Por otra parte, como las albúminas calentadas no dan precipitinas (Besredka), como las precipitaciones de grupo enmascaran los resultados, etc., pensamos ensayar la anafilaxia.

#### LA ANAFILAXIA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CARNES

Desde los trabajos fundamentales de Turró y González a la anafilaxia sérica, teníamos en proyecto hacer aplicación de la diferenciación de carnes. El haber dejado transcurrir tanto tiempo sin llevarlo a la práctica es causa de que hoy, al relatar los primeros resultados obtenidos, tengamos que hacer mención de los de otros investigadores.

Uhlenhuth y Haendel en 1910 hicieron la aplicación de la anafilaxia a la diferenciación de carnes tal vez los primeros. Decían ellos, poco más o menos:

Si en la mayoría de los casos el procedimiento de la diferenciación de albúminas, sangres, carnes, por precipitinas es suficiente y aun del mismo valor que la anafilaxia, hay casos donde esta última puede darnos señalados servicios. Así, por ejemplo, la reacción anafiláctica es un gran recurso cuando se trata de determinar la naturaleza de las carnes hervidas.

Se sabe, en efecto, que las albúminas hervidas no dan precipitación; por el contrario, según Besredka, las albúminas, aun calentadas a 100°, son susceptibles de sensibilizar al cobayo.

Gracias a la anafilaxia, los autores han podido determinar la naturaleza de momias teniendo miles de años. Por último, mostrándose impotente ambas en ciertos casos, la anafilaxia daría reacciones de especificidad allí donde las precipitinas no la dan.

Bauer, en 1911, dice que la anafilaxia sería preferible a la precipitación para diferenciar albúminas de sangre, carnes, habiendo conseguido denunciar carne de caballos en salchichas.

Con estos antecedentes, que nos evitaban tanteos previos, ya pudimos encaminarnos a la diferenciación de carnes sin desnaturalizar y hervidas. Desgraciadamente, la falta de cobayos y el haberse muerto el único destinado al esclarecimiento del segundo problema, son causa de que este trabajo, con todo y ser interesante, sea incompleto.

El detalle de experiencias es el siguiente: Dos cobayos reciben, como inoculación preparatoria, anafilactizante o sensibilizadora, proteínas de caballo; otro de burro, otro de cerdo, otro de buey, otro mixto de caballo y cerdo y, por último, un séptimo cobayo es inoculado con albúmina desnaturalizada de caballo.

*Cobayo núm. 1.*—Se le inyecta subcutáneamente 1 c. c.

de suero de caballo, y 17 días después se le somete a una inoculación intravenosa en la yugular de 0'50 c. c. de suero de cerdo y no le pasa nada. Media hora después recibe medio c. c. de suero de caballo y llega a morir, pero tardando mucho y sin síntomas tan característicos como el cobayo prueba. La acción del suero de cerdo sirvió de ligeramente vacunante.

*Cobayo núm. 2.* — Recibe 3 c. c. de jugo de carne obtenido por la sal y diluído al 1 x 5; 18 días después se le inocula por la yugular medio c. c. de suero de caballo y muere en uno o dos minutos con todo el cuadro característico de anafilaxia.

*Cobayo núm. 3.* — Recibe 2 c. c. de macerado de carne de burro, y a los 18 días medio c. c. de suero de caballo, sin presentar alteración notable.

Inoculado 24 horas después con medio c. c. de suero de burro, de los tres a los cuatro minutos empiezan a manifestarse fenómenos anafilácticos, llegando a los ocho a un estado de postración y somnolencia acentuado, permaneciendo tendido en el suelo, pero *consigue reponerse*.

*Cobayo núm. 4.* — Recibe 1 c. c. de suero de cerdo y 17 días después medio c. c. por la yugular, de suero de caballo, no manifestando alteración. Una hora después se le inocula por la otra yugular medio c. c. de suero de cerdo (homólogo) y muere en dos minutos de anafilaxia.

*Cobayo núm. 5.* — Un c. c. de suero de buey y 18 días después medio c. c. de suero de caballo, sin trastorno. Una hora después muere de anafilaxia por la inyección de medio c. c. de suero homólogo.

*Cobayo núm. 6.* — Recibe 1 c. c. de suero de caballo y medio c. c. de suero de cerdo; 18 días después se le inocula por la vena medio c. c. de suero de caballo y muere de anafilaxia.

Aunque estos resultados nos permiten establecer algunas conclusiones, como pensamos presentar un nuevo trabajo antes de finalizar el año, que sirva de complemento, hacemos punto en espera de sus resultados.

*Trabajo del Laboratorio Municipal, Plagas del Campo y Matadero de Barcelona.*