

## Contribución al estudio del precipitado toxina-antitoxina diftérica

Por Fernando Modern y Raúl Wernicke

Persiguiendo la obtención de antitoxinas diftéricas muy purificadas, es decir, de gran valor antitóxico con respecto a su contenido protéico nos preocupamos de estudiar las condiciones óptimas de recuperación de la antitoxina por disociación del precipitado toxina-antitoxina (que en adelante llamaremos T - A) obtenido siguiendo el método indicado por Ramón <sup>(1)</sup>.

Los datos existentes en la literatura al respecto son poco concretos, y no hemos encontrado ningún estudio sistemático sobre tan interesante problema.

De manera que hemos iniciado nuestras investigaciones por determinar la solubilidad del precipitado T - A. y luego los factores que influyen en su disociación a fin de establecer normas para la mejor recuperación de la antitoxina.

En nuestros ensayos hemos empleado los siguientes materiales:

Suero N° 339 .....	350 U.A./cm. <sup>3</sup>
"      — .....	200      "
"  N° 232 .....	1200      "
Toxina N° 232 con un L+ = 0,11	

La técnica para obtener el precipitado T - A fué la siguiente: Determinamos para cada suero el valor Kf (tiempo transcurrido, en minutos, hasta la aparición del precipitado en el primer tubo que flocula), calentando la serie de tubos que contienen la mezclas toxina-antitoxina en proporciones variables,

en un termostato a 56°. Cada vez que deseamos mayor cantidad de precipitado operamos en las mismas condiciones empleando la mezcla toxina-antitoxina en las proporciones correspondientes al tubo que más rápidamente floculaba. El precipitado permanecía 24 horas a la temperatura ambiente, en el líquido donde se generó, y luego se separaba por centrifugación y se suspendía en solución fisiológica. Nunca lavamos el precipitado excepto en un caso que consignamos y que lo hicimos empleando agua destilada.

Las medidas de unidades antitóxicas fueron hechas "in vivo", según el método de Ehrlich, neutralizando con bicarbonato de sodio la solución de antitoxina antes de mezclarla a la toxina.

Las medidas de pH fueron efectuadas potenciométricamente.

Hicimos las determinaciones de proteína por valoración del nitrógeno según Kjeldahl (volumétrico).

Los demás datos los consignamos en cada experimento.

#### SOLUBILIDAD DEL PRECIPITADO TOXINA-ANTITOXINA A DISTINTOS pH

Empezamos por determinar a que pH se obtiene una disolución completa del precipitado, al punto que proporcione un líquido perfectamente límpido. Usamos como disolvente ácido acético, ácido clorhídrico y mezclas reguladoras de Walpole (ácido acético - acetato sódico).

En el siguiente cuadro consignamos datos extraídos de diversos ensayos, en que hemos operado con precipitados obtenidos con distintos sueros y toxinas, obteniendo soluciones de distintas concentraciones. Se ve claramente que el precipitado toxina-antitoxina se disuelve perfectamente cuando la solución final tiene un pH no mayor de 3.6. En líquidos más ácidos se obtiene también una disolución completa y en cambio, para líquidos de pH mayores de 3.6 la solubilidad disminuye, pareciendo anularse a  $\pm$  pH = 5. Para mayores alcalinidades se observa una clarificación de la emulsión, pero la disolución no es completa ni aún a pH = 9.

CUADRO I

Suero	Toxina	Emulsión del ppdo T - A		DISOLVENTE			Volumen de solución fisiológica	LIQUIDO FINAL		
		Concentración*	Volumen	Clase	Volumen	pH		Volumen	pH	Aspecto
687	253	1:1	2 cm. <sup>3</sup>	CH <sub>3</sub> COOH N/10	6 cm. <sup>3</sup>	2.78	2 cm. <sup>3</sup>	10 cm. <sup>3</sup>	3.46	límpido
750	234	1:1	3 "	" "	7 "	2.78	—	10 "	3.54	"
687	253	1:1	2 "	" "	4 "	2.78	4 cm. <sup>3</sup>	10 "	3.67	opalescente
650	234	1:1	2 "	Mezcla Walpole	8 "	3.07	—	10 "	3.96	"
339	234	1:1	2 "	" "	8 "	4.16	—	10 "	4.72	Grumos depósito
339	234	1:1	2 "	" "	8 "	5.30	—	10 "	—	" "
339	235	2:1	1 "	CH <sub>3</sub> COOH N/10	9 "	2.78	—	10 "	2.98	límpido
339	235	2:1	2 "	" "	8 "	2.78	—	10 "	3.07	"
339	235	2:1	5 "	" "	10 "	2.78	—	15 "	3.29	"
339	234	1:1	1 "	Mozcla Walpole	4 "	3.29	—	5 "	—	"
339	234	1:1	1 "	" "	4 "	4.30	—	5 "	—	opalescente y. ppdo.
339	234	1:1	1 "	" "	4 "	5.32	—	5 "	—	turbios y. ppdo.
339	235	1:1	1 "	HCl $\frac{N}{100}$	4 "	2.20	—	5 "	—	límpido
339	235	1:1	1 "	HCl $\frac{N}{10}$	4 "	1.15	—	5 "	—	"

(\*) Referida al volumen del suero inicial. Cuando el precipitado T-A se suspende en un volumen de solución fisiológica igual al del suero inicial, su concentración es 1:1, y suspendido en un volumen igual a la mitad del suero inicial, su concentración es 2:1.

RECUPERACIÓN DE LA ANTITOXINA DIFTÉRICA POR DISOCIACIÓN  
DEL PRECIPITADO T - A

Ya Ramón observó que disolviendo en ácido acético diluído el precipitado T - A se disocia, destruyéndose la toxina y quedando libre en gran proporción, la antitoxina. No hemos encontrado en la literatura un estudio sistemático de tan interesante asunto, por lo cual nos preocupamos de dilucidar las condiciones en que la recuperación de antitoxina es óptima.

CUADRO II

Suero	Dilución	Disolvente	pH.	Medido a los	U A cm. <sup>3</sup>	Rendi- miento %
339	1:5	CH <sub>3</sub> COOH	2.78	5 días	30	43
770	1:60	„ „	2.94	6 „	8	40
339	1:5	„ „	2.98	4 „	30	43
339	2:5	„ „	3.07	4 „	65	46
339	2:3	„ „	3.29	4 „	100	43
339	1:5	Mezcla Walpole	3.29	5 „	30	43
339	3:10	CH <sub>3</sub> COOH	3.54	10 „	> 35	> 50
200 U.	1:9	„ „	3.62	3 „	15	54
339	1:5	Mezcla Walpole	3.96	6 „	15-25	< 36
339	1:5	„ „	4.30	5 „	4	—
339	1:5	„ „	4.72	6 „	< 5	—
339	1:5	„ „	5.32	5 „	< 2	—
339	1:5	„ „	5.50	6 „	< 5	—
200 U.	1:9	Na OH N/100	9.5	3 „	< 5	—
339	1:5	HCl N/100	—	3 „	< 20	< 28
339	1:5	HCl N/10	—	3 „	< 10	< 14

a) *Influencia del pH de la solución del precipitado T - A.*  
Las soluciones que ensayamos fueron hechas en disolventes cuyos pH variaban entre 1 y 9.5. No siempre obteníamos disolución completa del precipitado, pero asimismo determinamos las unidades antitóxicas disueltas, admitiendo la posibilidad de un fraccionamiento por solubilidad o insolubilidad selectiva de las antitoxinas.

En el cuadro N° 2 consignamos los resultados que hemos obtenido y en él se destaca claramente, que el máximo de recuperación se logra cuando la solución del precipitado T - A tiene un pH comprendido en la zona 3 - 3.6, que corresponde al límite de solubilidad.

b) *Influencia del tiempo transcurrido entre la disolución y la medición de unidades antitóxicas.* Hemos podido comprobar que si bien la disociación del precipitado se produce tan pronto como se lo disuelve en medio ácido, el poder antitóxico de esta solución crece a medida que transcurre el tiempo, para alcanzar un valor óptimo al cabo de varias semanas, observándose luego un decrecimiento en el contenido en antitoxinas.

En el cuadro N° 2 figuran los datos relativos a uno de nuestros ensayos, en el que hemos operado a distintos pH. Es bien evidente el aumento del poder antitóxico de la solución, que puede ser interpretado o bien por una disociación creciente del precipitado neutro, o por una destrucción creciente de la toxina libre. Creemos ser más aceptable la primera explicación por la poca estabilidad de la toxina en medios de pH tan bajos.

c) *Influencia de la temperatura a la que se mantiene la solución ácida del precipitado T - A.* Sometiendo las soluciones de precipitado neutro T - A obtenidos en iguales condiciones, a distintas temperaturas se obtienen distintos resultados en las proporciones antitóxicas recuperadas. Estos resultados se evidencian en los cuadros N° 3 y 4, en los que figuran los datos de disociaciones realizadas a 3°, 15° y 37° C.

CUADRO III

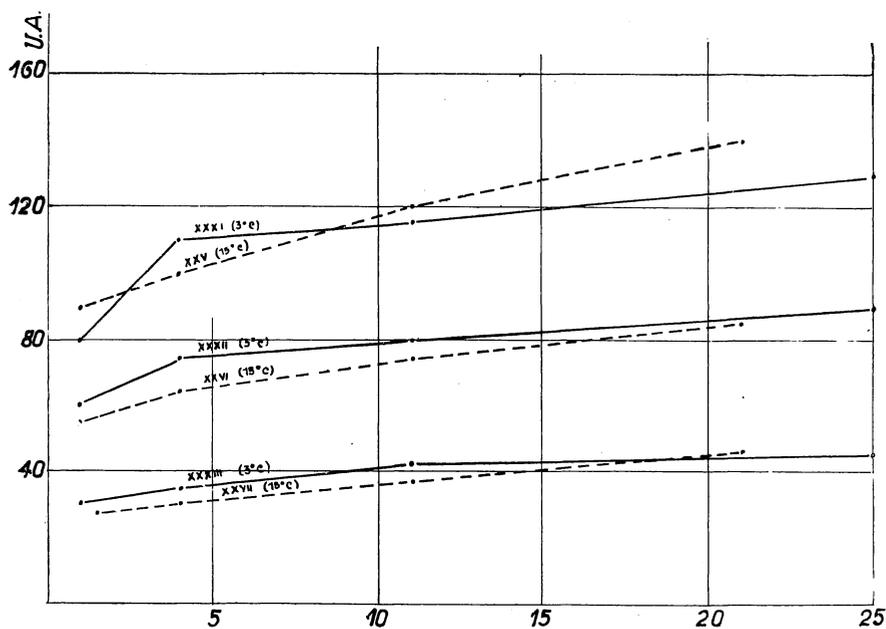
N.º	Volumen de la emulsión	Volumen Ac. acético N/10	Dilución v/r al suero	pH de la mezcla	Temperatura	Unidades antitóxicas recuperadas				Rendimiento
						23 h.	96 h.	11 días	25 días	
XXVIII	5 cm. <sup>3</sup>	10 cm. <sup>3</sup>	2:3	3.29	37°	> 95	120	< 100	95	40 %
XXIX	2 „	8 „	2:5	3.07	37°	> 60	< 65	< 55	45	32 %
XXX	1 „	9 „	1:5	2.98	37°	30	< 35	< 20	< 15	< 21 %
XXXI	5 cm. <sup>3</sup>	10 cm. <sup>3</sup>	2:3	3.29	3°	80	115	115	130	56
XXXII	2 „	8 „	2:5	3.07	3°	> 60	75	80	90	64
XXXIII	1 „	9 „	2:10	2.98	3°	30	35	42	45	64

CUADRO IV

N.º	Volumen de la emulsión	Volumen Ac. acético N/10	pH de la mezcla	Unidades antitoxicas p. cm. <sup>3</sup> recuperadas a					Rendimiento
				22 h.	39 h.	96 h.	11 días	21 días	
XXV	5 cm. <sup>3</sup>	10 cm. <sup>3</sup>	3.29	90	< 95	100	120	140	60 %
XXVI	2 „	8 „	3.07	55	< 60	65	75	85	61 %
XXVII	1 „	9 „	2.98	> 25	27	30	37	47	67 %

A baja temperatura la recuperación es más lenta e incompleta, pero a 37° sobreviene la destrucción de la antitoxina que disminuye grandemente las proporciones de unidades antitoxicas recuperadas.

Es por lo tanto, conveniente efectuar las disociaciones a temperaturas que oscilan entre 10° - 15°



Influencia del tiempo y temperatura en la recuperación de antitoxina del precipitado toxina-antitoxina.

RENDIMIENTO Y CONTENIDO PROTEICO DE LA ANTITOXINA  
RECUPERADA

El estudio del precipitado T - A ofrecía para nosotros especial interés por la posibilidad que su disociación nos brindaba, de obtener una antitoxina de gran pureza. Nos importaba en sumo grado, conocer la proporción de antitoxina recuperada con respecto a la empleada para obtener el precipitado, es decir, el rendimiento de la recuperación, y además tenía especial importancia para nosotros conocer el grado de purificación alcanzado, expresado por el aumento de unidades antitóxicas ligadas a un gramo de proteína.

En el cuadro N° 5 figura el rendimiento a distintas diluciones (1:3, 1:5 y 1:10) de un suero que contenía 350 U.A. por cm.<sup>3</sup>.

CUADRO V

N.º	Dilución de la suspensión de ppdo. Ramón	Dilución con respecto al suero original	Proteína %	U A	U A	Rendimiento
				cm. <sup>3</sup>	gr. proteína	
XXXIV	1:3	2:3	0.23	140	60.900	60 %
XXXV	1:5	2:5	0.13	85	65.300	61 %
XXXVI	1:10	1:5	0.065	47	72.300	67 %

En el siguiente cuadro N° 6, consignamos la recuperación de antitoxina, del precipitado T - A obtenida de un suero de gran valor antitóxico.

CUADRO VI

Toxina	Suero	Kf a 56°		pH	Dilución	Unidades antitóxicas recuperadas a os			Rendimiento
						6 días	9 días	36	
49 cm. <sup>3</sup>	0.315 cm. <sup>3</sup>	30'	disuelto	2,94	1.64	—	—	—	—
49 „	0.35 „	25'	el ppdo.	2,94	1.57	8	13	17	100%
49 „	0.385 „	40'	en 20 cm. <sup>3</sup> CH.COOH $\frac{N}{10}$	2,94	1.52	8	—	—	—

El rendimiento en la recuperación es máximo a la temperatura de 15° y además es muy acentuado el efecto de la dilución (comparar cuadro 5 con cuadro 6). Para diluciones 1:57 nos ha sido posible recuperar el 100 % de la antitoxina.

Es evidente que cuanto mayor es el rendimiento de la recuperación mayor es el contenido de unidades antitóxicas por gramo de proteína. En el caso del suero N° 750 (cuadro 6) que tiene 1200 U. A. por cm.<sup>3</sup> cuyo precipitado disuelto en CH<sub>3</sub>-COOH <sup>N</sup>/<sub>10</sub> en una dilución 1:57 nos dió al cabo de 36 días de estar mantenido a 15° un contenido de 17 U. A. por cm.<sup>3</sup> o sea el 100 % del valor original, *que representa un valor de más de 100.000 U.A. por gramo de proteína*, como tendremos oportunidad de confirmarlo en una próxima comunicación en la que informaremos más detenidamente sobre nuestras actuales investigaciones relativas a la obtención de antitoxinas en alto grado de purificación.

#### CONCLUSIONES

1. Hemos comprobado que el precipitado T - A requiere una acidez mínima correspondiente a un pH = 3.6 para entrar completamente en solución y que no es completamente soluble a mayores pH.

2. Manteniendo en medio ácido la solución del precipitado T - A se recupera la antitoxina. Esta recuperación es máxima para medios comprendidos en la zona pH = 3.2 a pH = 3.6.

3. La recuperación depende de la temperatura a la que es mantenida la solución ácida del precipitado T - A siendo máxima para la temperatura de 10° - 15° C.

4. A medida que transcurre el tiempo a partir del instante en que se ha disuelto el precipitado T - A aumenta el contenido de unidades antitóxicas de la solución.

5. El rendimiento de unidades antitóxicas recuperadas del precipitado T - A aumenta con su dilución en la solución ácida y en algunos casos la relación  $\frac{U. A.}{Prot.}$  ha alcanzado valores más de 18 veces mayores que la del suero original.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. — RAMÓN G. C. R. *Soc. Biol.* Tomo LXXXVI, pág. 711, año 1922; tomo LXXXVI, pág. 813, año 1922, y tomo LXXXVIII, pág. 167, año 1923.
1. — RAMÓN G. *Ann. Inst. Pasteur.* Tomo XXXVIII, pág. 1, año 1924.