

## La purificación del suero antidiftérico por coagulación térmica en presencia de sales

Por Raúl Wernicke y Fernando Modern

La purificación de sueros antitóxicos por coagulación térmica depende de varios factores: a), termolabilidad de la antitoxina; b), insolubilización en presencia de sales y por efecto del calor, de las proteínas no activas; c), solubilidad de las proteínas antitóxicas en soluciones salinas; etc.

Teniendo en cuenta estos tres factores, que consideramos los más importantes para encarar la posible solución del problema propuesto y teniendo presente los ensayos realizados por Frouin (C. R. Soc. Biol. 1908 y sig.) nos propusimos averiguar si modificando la concentración y naturaleza de la sal coagulante, el tiempo de calentamiento, la naturaleza y concentración de la solución salina empleada para extraer el coágulo, así como el tiempo de extracción, era posible llegar a soluciones de proteínas ricas en antitoxinas que hicieran factible la purificación y concentración de sueros.

Las sales ensayadas por nosotros son  $\text{ClNa}$ ,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  modificando la reacción del medio entre pH 5 y más de 9.

La coagulación la realizábamos en baño-maría a las temperaturas de 65° ó 70°, durante tiempos que oscilaban entre 10' y 60'. Las extracciones de los coágulos las hacíamos a la temperatura ambiente, prologándolas a veces por muchos días.

En el siguiente cuadro resumimos nuestros resultados obtenidos sobre un suero común de 325 U.A.  $\text{cm}^3$  con un contenido de 7.5 % de proteínas, que representa 4330 U.A. por gramo de proteína.

*Recibido para publicarse, setiembre 1930.*

	Coagulación			Extracción del coágulo			Líquido de extracción			
	Coagulante	Volúmen ( <sup>1</sup> )	Duración	Líquido extractor	Duración	Volúmen ( <sup>1</sup> )	Proteína %	U A cm. <sup>3</sup>	U A l gr. Prot.	Rendi- miento
1	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 24 %...	1	10' a 70°	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 30 %....	4 días	10	0.47	< 30	< 6400	< 92 %
2	" 30 " "	1	10' a 70°	" " " "	" "	10	0.42	> 30	> 6600	> 92 "
3	" 36 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.40	< 30	< 7500	< 92 "
4	" 40 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.43	< 30	< 7000	< 92 "
5	" 44 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.57	> 30	> 5300	> 92 "
6	" 50 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.54	> 30	> 5500	> 92 "
7	" 54 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.66	> 30	> 4500	> 92 "
8	" 60 " "	1	" "	" " " "	" "	10	0.60	> 30	> 5000	> 92 "
9	" * 40 " "	1.4	" "	" 40 %....	3 "	10	0.31	> 10	> 3200	> 31 "
10	" * 40 " "	1.4	20'	" " " "	" "	10	0.23	> 10	> 4350	> 31 "
11	" * 40 " "	1.4	40'	" " " "	" "	10	0.16	< 10	< 6000	< 31 "
12	" * 40 " "	1.4	60'	" " " "	" "	10	0.12	< 10	< 8300	< 31 "
13	" * 40 " "	1.4	20' a 70°	" 30 %....	1 "	10	0.42	< 25	< 5900	< 76 "
14	" * 40 " "	1.4	20'	" ** " "	" "	10	0.35	< 20	< 6000	< 61 "
15	" * 40 " "	1.4	45'	" ** " "	" "	10	0.28	< 20	< 7000	< 61 "
16	" * 40 " "	1.4	45'	" ** " "	" "	10	0.26	< 20	< 7700	< 61 "
17	Cl Na sat pH = 5.2..	1	10' a 70°	Cl Na sat pH: 5.3..	3 "	10	0.22	15	6810	46 "
18	" " " "	1	" "	" " " = 6.1..	" "	10	0.24	18	7500	56 "
19	" " " "	1	" "	" " " = 8.1..	" "	10	0.30	18	6000	56 "
20	" " " "	1	" "	" " " = 9..	" "	10	—	18	—	56 "
21	" " " "	1	" "	" " " > 9..	" "	10	0.36	18	5000	56 "
22	" " " "	1	" "	" " " > 9..	" "	10	—	18	—	56 "
23	Cl Na sat.....	1	" "	Cl Na sat.....	" "	10	0.73	60	8220	56 "
24	" " " ".....	1	" "	" " " ".....	" "	10	0.20	22	11000	69 "

\* La concentración se refiere a porcentaje de saturación.

\*\* Estos líquidos contenían 4 % de CO<sub>3</sub> Na H.<sup>(1)</sup> Expresa el volumen de líquido que contiene 1 volumen de suero original.

	Coagulación			Extracción del coágulo			Líquido de extracción			
	Coagulante	Volúmen (1)	Duración	Líquido extractor	Duración	Volúmen (1)	Proteína %	U A cm. <sup>3</sup>	U A l gr. Prot.	Rendimiento
25	Cl Na sat+5% glicer.	1	10' a 70°	Cl Na sat.....	3 días	10	0.88	65	7600	60 %
26	" " " " "	1	" "	" " " " "	" "	10	0.24	20	8330	62 "
27	Cl Na " " " " "	10	" "	" " " " "	2 "	10	0.56	27	4820	83 "
28	Cl Na sat pH=6.7..	5	" "	" " " " "	" "	5	0.56	45	8030	70 "
29	" " " " =6.1..	5	" "	" " " " "	" "	5	0.60	45	7500	70 "
30	" " " " =5.8..	5	" "	" " " " "	" "	5	0.54	45	8330	70 "
31	" " " " =5.4..	5	" "	" " " " "	" "	5	0.52	50	9610	77 "
32	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 1/3 sat..	3	" "	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 1/3 sat...	1 "	3	1.65	> 90	> 5400	80 "
33	" " " " " "	3	" "	" " " " " "	" "	3	1.54	100	6500	90 "
34	" " " " " "	3	" "	" " " " " "	" "	10	0.46	30	6500	94 "
35	Cl Na sat.....	1	" "	" " " " " "	" "	3	0.20	< 20	< 10000	> 20 "
36	" " " " " "	1	" "	" " " " " "	" "	10	0.175	15	8570	47 "
37	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 1/4 sat..	1	" "	" " " " " "	2 "	3	1.28	50	3900	45 "
38	" " " " " "	1	" "	" " " " " "	2 "	10	0.51	> 30	> 6000	> 94 "
39	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	3	1.56	> 80	> 5000	> 74 "
40	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	4 "	10	0.51	> 30	> 6000	> 94 "
41	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	10	0.46	> 30	> 6450	94 "
42	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	3	1.33	> 80	> 6000	> 74 "
43	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	4	1.10	65	6000	80 "
44	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	5	0.86	50	5800	77 "
45	" " " " " "	1.5	" "	" " " " " "	2 "	7	0.74	< 35	< 4700	< 76 "
46	" " " " " "	2	" "	" " " " " "	2 "	10	0.38	30	7890	94 "
47	SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 10 H <sub>2</sub> O 20%	10	" "	SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 10 H <sub>2</sub> O 20%	15 "	10	0.37	< 32	< 8650	> 96 "
48	" " " " 24%	10	" "	" " " " 24%	15 "	10	0.40	> 25	> 6250	> 76 "
49	" " " " 27%	10	" "	" " " " 27%	15 "	10	0.48	30	6250	92 "

(1) Expresa el volumen de líquido que contiene 1 volumen de suero original.

En este cuadro damos los datos referentes a los dos procesos, de coagulación y extracción del coágulo y a saber: sal empleada y su concentración, pH del medio, proporción de suero en la mezcla. Además proporcionamos los datos sobre contenido protéico y unidades antitóxicas del extracto filtrado, así como de la proporción de U.A. por gramo de proteína y rendimiento con respecto a la cantidad de antitoxinas contenidas en el suero inicial. Las columnas con el encabezamiento "volumen" indican el volumen de líquido total que contiene un volumen original, sea durante la coagulación o la extracción del coágulo.

En nuestros ensayos hemos procedido sistemáticamente de la misma manera: 10-20cm.<sup>3</sup> suero, adicionados de sal (sólido) o de soluciones saturadas y agua además, a veces, a fin de obtener los volúmenes y concentraciones indicados en el cuadro, eran introducidos en tubos de ensayo y calentados a 70°. Esta temperatura es la más elevada que toleran las antitoxinas sin destrucción apreciable, durante tiempos que no excedan de algunos minutos.

El suero coagulado en la operación anterior es enfriado y agregado a una solución conveniente para obtener los volúmenes y concentración de extracción indicados en el cuadro. Se agitan frecuentemente estas suspensiones y se las filtra a las pocas horas o a los días. En los filtrados medíamos unidades antitóxicas por el método de Ehrlich y contenido protéico por gravimetría.

#### RESULTADOS

1. La coagulación térmica en presencia de sales, durante 10' a 70° C. provoca siempre una destrucción de antitoxina diftérica.

2. Esta destrucción aumenta con la duración del calentamiento y la concentración salina.

3. Los líquidos obtenidos son generalmente más pobres en proteínas, con respecto a su contenido antitóxico, que el suero original.

4. Por lo tanto se obtiene regularmente un aumento en el valor de la relación  $\frac{\text{U. A.}}{\text{1 gramo prot.}}$  que llega en numerosos casos al doble del valor inicial pero que nunca alcanza a triplicarlo.

5. Los rendimientos en la recuperación de antitoxinas son variables y por lo general superiores al 60 %. Se alcanzan valores de 92-95 %.

6. Las sales sulfato amónico y sulfato sódico parecen dar mejores resultados que el ClNa en el rendimiento de la recuperación de antitoxinas, pero son inferiores en cuanto al enriquecimiento de las proteínas en unidades antitóxicas.