Concentración y purificación de toxoide diftérico

(Primera comunicación)

por F. Modern, G. Ruff y A. Gatti

Como ya lo hemos publicado en un trabajo anterior (1), empleando el nuevo medio de cultivo para la obtención de toxina, se obtiene en la rutina diaria un valor de 45 á 50 Lf. por cm.³ Esto fué un adelanto importante, pues en el medio anterior solo se obtenían partidas de unos 20 Lf. como promedio. De acuerdo con el trabajo de Sordelli, Savino y Ferrari (2) la toxina que usaban anteriormente no daba pérdidas de los Lf. presentes, al ser transformada en toxoide por la acción del formol.

Sistemáticamente, no se estudió la atenuación que sufría este toxoide con el nuevo medio por el solo hecho de la permanencia a 35°C. durante un mes, con el agregado de 6 ‰ de formol. Este caldo tiene una constitución distinta del empleado anteriormente, y se pudo observar que si el pH era superior a 8,2 (rojo a la fenolftaleina), se atenuaba ya el 40 % en algunos casos durante la transformación de la toxina en toxoide. En cambio, si esta operación se hace a pH 7,2 7,4, prácticamente no se observan pérdidas. Por este motivo, la sección toxina, a cargo del Dr. Quiroga, neutraliza el medio antes de transformar la toxina en toxoide. También se observó que la pérdida es elevada en la zona ácida (pH 5).

Por otra parte, la concentración de un toxoide recién preparado da menos pérdidas en Lf. que un toxoide mantenido durante meses a temperatura ambiente. Esta pérdida puede aún ser disminuída, agregando un toxoide preparado con un medio que contenga peptona Parke Davis, o agregando la peptona sola, en determinadas concentraciones, como lo hace la sección vacunas.

Otra forma de disminuir la pérdida es agregando un 10 % de cloruro de sodio al toxoide, antes de precipitarlo, hecho observado por el Dr. Pirosky, y que nosotros hemos podido confirmar (comunicación verbal). Sin embargo, con todos estos métodos no ha sido posible evitar toda pérdida.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 2 de julio de 1946.

Conseguimos nosotros una recuperación total si previamente, concentrábamos al vacío el toxoide nativo (10 veces), antes de precipitar el principio activo en su punto isoeléctrico. Sin embargo la pureza obtenida en esta forma es menor que la que se consigue precipitando directamente el toxoide nativo. Si bien con una segunda precipitación hemos conseguido una pureza mayor no fué posible evitar la pérdida que en muchas partidas de toxoide se ha producido.

Pudimos observar, que si precipitamos por ácido otra vez el toxoide concentrado (± 400 Lf. X cm^3.) en su punto isoelétrico, y que se usa actualmente en la preparación de la vacuna, conseguíamos una purificación extraordinaria sin pérdida de los Lf.

Los toxoides contienen actualmente alrededor de 1,5 gama de nitrógeno por Lf., y son los que se usan en la preparación de la vacuna. Por este procedimiento conseguimos un toxoide que contiene regularmente menos de 0,8 gama de nitrógeno por Lf. Esta pureza debe considerarse como muy buena ya que Eaton (3) y Pappenheimer (4), por procedimientos largos y difíciles, consiguen aislar la toxina al estado puro, conteniendo 0,46 gama de nitrógeno por Lf. Según estos autores es la purificación máxima posible de la toxina y su conversión en toxoide por el formol no modifica la relación del nitrógeno en los Lf.

Pope y Linggood (5), purificando el toxoide por ultrafiltración, seguida por una adsorción con alumbre y elución con fosfato de sodio consiguen obtener 1.500 Lf. por mg. de nitrógeno. En el año 1942, los Dres. I. Pirosky y R. R. de Pirosky (6), estudian la purificación de toxoide diftérico obtenido en medio simplificado y consiguen un valor de 0,56 gama de nitrógeno por Lf., precipitando el toxoide en el punto isoeléctrico, y subsiguiente tratamiento con fosfato de amonio al 1/3 de saturación, pero con solo un rendimiento del 50 % de los Lf. Encuentran que la capacidad vacunante del antígeno es igual a la del toxoide original.

Nosotros en este trabajo estudiamos una purificación del toxoide adaptado a la rutina, y encontramos que simplemente una precipitación por ácido del toxoide concentrado, da un valor de pureza muy aproximado a las descriptas anteriormente, y sin pérdidas en los Lf. del concentrado.

En estos ensayos conseguimos fácilmente 2.000 Lf. por miligramo de nitrógeno.

Esta purificación debe tener interés ya que es posible duplicar el contenido en Lf. de la vacuna, y por lo tanto aumentar el poder inmunizante, sin aumentar el nitrógeno total, índice de la pureza de la vacuna.

Hicimos ensayos exploratrices del poder vacunante de este toxoide purificado, y de su toxicidad, además de la influencia del gel Al $(OH)_3$ en la vacuna. Naturalmente, esto debe ser motivo de un estudio más prolijo y amplio, antes de adaptarse a la rutina

Por iniciativa del Dr. Pico, encaramos el problema de la purificación del toxoide, del punto de vista químico, y nos propusimos resolver dos problemas: el primero, la recuperación máxima de los Lf. del toxoide nativo, y el segundo, la purificación, entendiendo por tal la disminución del nitrógeno presente hasta el grado máximo posible.

CONCENTRACIÓN DE TOXOIDES AL VACÍO

El toxoide se lleva a pH 7-7,2 y se concentra al vacío (baño maría), hasta la décima parte de su volumen original. La temperatura del baño no debe pasar de los 50°C., ya que trabajando en esas condiciones se consigue evitar la formación de espuma, que puede dificultar la concentración. Una vez terminada la misma, se vuelve a corregir el pH (7,0).

La primera precipitación del toxoide se efectúa a pH ± 3,5, la segunda a un pH aproximado de 4, y la tercera a un pH de ± 5.

Como puede verse en el cuadro 1, concentrando el toxoide al vacío 10 veces, no se pierden los Lf presentes, y en general hay una pequeña disminución en el contenido de nitrógeno, debido a una precipitación que se produce en la concentración, y que se elimina por filtración.

Si se precipita el toxoide concentrado con ácido sulfúrico y se redisuelve el precipitado (1ra. redisolución), la pérdida no es mayor del 10 %, pero en general la purificación no es mejor que la obtenida actualmente por el método rutinario. Una segunda precipitación, seguida de la redisolución del precipitado (2ª redisolución), da una buena purificación, pero se obtiene otra pérdida que difícilmente es menor del 20 %.

En general, esta 2ª redisolución da un valor en nitrógeno inferior a 1 gama por Lf. salvo en el toxoide 1.595, cuyo nitrógeno es superior a 1 gama por Lf.

Tratamos de reprecipitar el toxoide por 3ª vez, sin resultado pues el toxoide así tratado no flocula, salvo en el último ejemplo del cuadro, en el cual, a pesar de no haber pérdida, la floculación es sumamente lenta, alrededor de 6 horas.

Si el toxoide concentrado al vacío (1.593) diez veces se dializa, sólo se pierde el 14 % en la precipitación. El toxoide contiene 0,75 gama de nitrógeno por Lf., valor de pureza que puede considerarse como muy bueno. El mismo toxoide si se precipita sin dializar sólo da 2,1 gama de nitrógeno por Lf.

Como puede verse por el cuadro anterior, los toxoides que provienen de medios que contienen sólo peptona Parke Davis son más difícilmente purificables, aun precedidos de una diálisis. Los mejores resultados los hemos obtenido agregando al toxoide preparado con peptona Instituto, un 25 % de toxoide elaborado con peptona Parke Davis.

CUADRO 1

TOXOIDE	Original Lf./cm³.	Conc. 10 veces Lf./cm³.	Pérdida	1.ª redisolución Lf./cm³.	Pérdida	2.ª redisolución Lf/cm³.	Pérdida total	3.ª redisolución Lf./cm³.
Instituto + 25 % P. D.	33	330	0	300 1Lf = 3 gama N	10 %	200 1Lf = 0,77 gama N	40 %	—
N.º 1593 (Instituto)	32	325	0	300 1Lf = 2,1 gama N	8 %	250 1Lf = 0,616 gama N	23 %	—
N.º 1593, 10 veces concentrado y dializado	32	—	—	280 1Lf = 0,75 gama N	14 %	—	—	—
N.º 1613 (Instituto)	18 1Lf = 235,3 gama N	180 1Lf = 195,2 gama N	0	180 1Lf = 3,58 gama N	0	100	45 %	—
N.º 1595 (P. D.)	25	250	0	250 1Lf = 12,18 gama N	0	200 1Lf = 2,03 gama N	20 %	—
N.º 1595, 10 veces concentrado y dializado	25	—	—	200 1Lf = 4,43 gama N	20 %	200 1Lf = 1,68 gama N	20 %	—
N.º 1610 (P. D.)	32	325	0	325 1Lf = 6,67 gama N	0	325 1Lf = 1 gama N	0	—
N.º 1610, 10 veces concentrado y dializado	32	—	—	275 1Lf = 1,78 gama N	14 %	275 1 Lf = 1 gama N	14 %	—
N.º 1611 (Instituto)	30 1Lf = 116,6 gama N	300 1Lf = 155,6 gama N	0	300 1Lf = 1,75 gama N	0	200 1Lf = 0,515 gama N	33 %	No flocula
N.º 1629 (Instituto)	25 1Lf = 148 gama N	250 1Lf = 152,6 gama N	0	250 1Lf = 2,38 gama N	0	150 1Lf = 0,51 gama N	40 %	—
N.º 1630 (Instituto)	22 1Lf = 186 gama N	225 1Lf = 158,7 gama N	0	225 1Lf = 2,36 gama N	0	125 1Lf = 0,81 gama N	45 %	—
Instituto + 25 % P. D.	30 1Lf = 127,7 gama N	260 1Lf = 149,5 gama N	14 %	260 1Lf = 5 gama N	14 %	260 1Lf = 0,75 gama N	14 %	260 1Lf = 0,53 gama N

CONCENTRACIÓN DE TOXOIDES POR ÁCIDO

Ya en un trabajo anterior (loc. cit.) decíamos que el toxoide preparado con este nuevo medio de cultivo podía precipitarse dos veces a pH 3,8, sin que la pérdida fuera mayor del 15,5 %. Sin embargo la vacuna se preparó con una sola purificación en su punto isoeléctrico. Interesado en conseguir una purificación mayor del toxoide, ensayamos sistemáticamente la precipitación del toxoide concentrado en la rutina, es decir una nueva precipitación del toxoide ya concentrado y purificado. Con sorpresa comprobamos que prácticamente en esta operación, precipitando un toxoide de por lo menos 400 Lf. por cm^3. no se perdía valor. Por otra parte, se conseguía eliminar una porción grande del nitrógeno presente. El toxoide común concentrado y purificado por solo una precipitación en su punto isoeléctrico, contenía de 1,4 gama a 1,7 gama de nitrógeno por Lf. Si se volvía a concentrar por el mismo procedimiento, el nitrógeno presente era sólo de 0,7 gama a 0,9 gama por Lf.

Esta purificación tiene mucha importancia, pues permitiría, si fuese necesario, aumentar las dosis floculantes de la vacuna actual al doble, sin introducir más substancias proteicas que las que tiene actualmente.

En el cuadro 2 se estudia la concentración de seis toxoides y puede verse que sólo en un caso hemos tenido una pérdida del 21 %; en los demás casos, prácticamente no se ha perdido nada.

También puede verse en el mismo cuadro, que no se mejora el toxoide con más precipitaciones en el punto isoeléctrico.

Creemos, por lo tanto, que el toxoide nativo, precipitado como se hace actualmente, y seguido como lo hemos hecho nosotros, de una precipitación ulterior, permite obtener un toxoide de gran pureza, que debe ser de una gran eficacia vacunante. Naturalmente, esta última parte debe ser objeto de un minucioso estudio antes de ponerla en práctica.

Inyectando 500 Lf., a 5 cobayos, del toxoide purificado y del usado actualmente en la rutina no se observan fenómenos tóxicos, aumentando el peso de los cobayos paulatinamente hasta los 40 días de observación.

Preparando la vacuna como se hace habitualmente en el Instituto, agregando al toxoide el gel de hidrato de aluminio (2) e inyectando 5 Lf. por cobayo, se puede observar a los 40 días:

a) La vacuna preparada con el toxoide habitual, dió más de 1 U.A., y menos de 2 U.A., que es el valor antitóxico aceptado.

b) La vacuna preparada con el toxoide purificado por nosotros, dió como promedio, un valor de 3 U.A., inyectando también 5 Lf. por cobayo.

CUADRO 2

Toxoide concentr. por rutina Lf./cm³.	1.ª redisolución Lf./cm³.	Pérdida	2.ª redisolución Lf./cm³.	Pérdida	3.ª redisolución Lf./cm³.	Pérdida	Pérdida total
625 1Lf = 1,63 gama N	555 1Lf = 0,77 gama N	21 %	—	—	—	—	21 %
500 1Lf = 1,42 gama N	500 1Lf = 0,8 gama N	0	480 1Lf = 0,81 gama N	4 %	420 1Lf = 0,9 gama N	12,5 %	16 %
410 1Lf = 1,7 gama N	385 1Lf = 0,93 gama N	6 %	350 1Lf = 0,84 gama N	9 %	—	—	14,7 %
500 1Lf = 1,68 gama N	500 1Lf = 0,70 gama N	0	—	—	—	—	0
555 1Lf = 1,41 gama N	525 1Lf = 0,86 gama N	5,4 %	500 1Lf = 0,86 gama N	4,8 %	420 1Lf = 0,95 gama N	16 %	24,3 %
450 1Lf = 1,36 gama N	450 1Lf = 0,65 gama N	0	—	—	—	—	0

Nosotros creemos que por la purificación se produce un complejo toxoide-gel, más estable que el anterior, y que puede ser la razón del mayor valor encontrado. Este ensayo se realizó con sólo lotes de 5 cobayos cada uno y naturalmente no sacamos conclusiones definitivas.

Con el objeto de confirmar este ensayo en pequeño hemos inyectado, hace días un gran lote de cobayos, que nos permitirá informar en una segunda comunicación sobre los resultados obtenidos.

Creemos, además, que de aplicarse estas nuevas técnicas, deberá otra comisión encargarse de un prolijo estudio del poder vacunante y de otras condiciones de la vacuna antidiftérica (ser inocua, estéril, y desprovista de toxicidad).

CONCLUSIONES

1º) Se describe primeramente una técnica que permite concentrar al vacío el toxoide diftérico diez veces, sin pérdida de los Lf. presentes. El toxoide concentrado es luego purificado por precipitación con ácido sulfúrico, y si bien la pérdida no es mayor, en general, del 10 %, la pureza es de sólo 2 a 3 gamas de nitrógeno por Lf.

Una segunda precipitación por ácido da una buena purificación ($\pm$ 0,9 gama de nitrógeno por Lf.), pero una pérdida alrededor del 20 % del valor inicial.

Si el toxoide se dializa, después de concentrado, la pérdida es inferior al 14 % consiguiendo un toxoide que contiene 0,75 gama de nitrógeno por Lf. Los mejores resultados se obtuvieron agregando al toxoide preparado con peptona Instituto un 25 % de toxoide elaborado con peptona Parke Davis.

2.) Como el toxoide común concentrado y purificado por una sola precipitación en su punto isoeléctrico contenía 1,4 gama a 1,7 gama de nitrógeno por Lf. lo volvimos a concentrar por una nueva precipitación. Conseguimos así un toxoide que sólo contenía de 0,7 gama a 0,9 gama de nitrógeno por Lf., con recuperación cuantitativa en su valor.

BIBLIOGRAFÍA

1. SORDELLI A. FERRARI J., GVIRTZMAN J., MODERN *F.*, *RUFF* G. y REPETTO, O — Revista Instituto Bacteriológico, **12**, 1, 83, 1943.
2. SORDELLI A., SAVINO E., y FERRARI J. — Revista Instituto Bacteriológico, **6**, 5, 687, 1935.
3. EATON M. D. — J. Bact., **31**, 347, 1936
4. PAPPENHEIMER A. — J. Biol. Chem., **120**, 543, 1937.
5. POPE, C. G. y LINGGOOD F. V. — Brit. Exp. Path, **20**, 207, 1942.
6. PIROSKY I. y PIROSKY R. R. DE. — Revista Inst. Bact., **11**, 1, 118, 1942.