

Termolabilidad de sueros antidiftéricos, nativos, concentrados y proteolizados

por Guillermo Ruff y Fernando Modern

Preparación del suero antidiftérico proteolizado

Al suero antidiftérico le agregamos igual volumen de agua y luego 2 % de pepsina (P. D. 1/10.000) Se llevó con ácido sulfúrico N/10 a pH 3,9 y calentó por espacio de 4 horas a 45°C. Para eliminar el exceso de pepsina se le agregó fosfato de calcio obtenido por la técnica de Utkin (1), y se filtró. El filtrado se precipita con sulfato de sodio al 22 %, y el precipitado es llevado al volumen primitivo (del suero), con agua destilada, siguiendo en líneas generales la técnica descrita por Parflenjef. Por último, este suero es purificado por ultrafiltración, empleando bujías de alundum impregnadas en colodión (2), (3).

Por el agregado de solución fisiológica, y repetidas ultrafiltraciones se consiguen eliminar cuantitativamente las albumosas formadas durante la proteolisis del suero, de acuerdo a los ensayos publicados por nosotros (4). Finalmente, se lleva el suero así purificado al volumen deseado y se filtra por Seitz o bujía común, para conservarlo estéril.

Por este procedimiento hemos logrado sueros muy puros, que daban una relación de purificación de más de 44.000 unidades por gramo de proteína. Este valor se obtuvo en uno de los últimos ensayos: el suero daba 1.500 unidades, con un contenido proteico de 3,34 %.

Para estos experimentos se empleó un suero de buen valor, que contenía 1.200 unidades por cm³ y 8,6 % de proteínas, es decir una relación de 14.000 unidades por gramo de proteína. Usamos también para estos ensayos sueros antidiftéricos sin concentrar y concentrados por el método salino (SO₄Na₂).

En líneas generales, el método que se emplea para obtener sueros concentrados es el siguiente: primeramente el plasma es desfibri-

nado y luego el suero se precipita con SO_4Na_2 al 22 % (concentración final) a 45°C . Las globulinas son lavadas con SO_4Na_2 al 23 %; se cristaliza en cámara fría el exceso de SO_4Na_2 , y el suero se fenica y se envasa estérilmente, tratando que el volumen final sea de $1/3$ a $1/4$ del primitivo.

En estos ensayos sobre termolabilidad de los sueros antidiftéricos, se emplearon cinco sueros antidiftéricos distintos: 3 sueros proteolizados, un suero nativo y un suero concentrado por el método salino antes descrito.

Para trabajar en condiciones similares fueron previamente dializados 100 cm^3 de cada suero, hasta tanto el líquido exterior no diera reacción positiva de iones Cl^- y $\text{SO}_4^{=}$. Terminada la diálisis, se midió el volumen, y se agregó 5‰ de ClNa a cada suero.

CUADRO 1

SUERO N.º	Volumen Dializado	Volumen al término de la diálisis	ClNa agregado	U A./ cm^3
1) Suero proteolizado Serie 0 ..	100 cm^3	125 cm^3	0,625	1.100
2) Suero proteolizado Serie 1 ..	100 cm^3	125 cm^3	0,625	1.150
3) Suero proteolizado Serie 2 ..	100 cm^3	135 cm^3	0,675	720
4) Suero nativo N.º 4139	100 cm^3	140 cm^3	0,700	540
5) Suero concentrado N.º 4097 .	100 cm^3	180 cm^3	0,900	1.150

Como el menor valor corresponde al suero 4 (540 u.a.) se llevan los otros sueros a la misma concentración en unidades, por dilución con Cl Na al 5‰ . Por seguridad, se comprueba finalmente, después de haber hecho las diluciones, el valor antitóxico calculado.

Termorresistencia de los sueros:

Las cinco muestras contienen por lo tanto 540 u.a. y 5‰ de ClNa . Los ensayos se hacen con 5 cm^3 de cada suero, y calentados al baño maría con aproximación de $0,5^\circ\text{C}$. por lo menos. Se observa inmediatamente, si se tiene la precaución de elevar la temperatura lentamente, que a 67°C . los sueros proteolizados (sueros 1, 2 y 3) se vuelven opalescentes, y empiezan a coagular a 69°C . El suero nativo (Nº4) tiene un aspecto menos opalescente a 67°C . aumenta la turbidez a $69\text{-}70^\circ\text{C}$. y comienza a coagular a 72°C .

El suero concentrado Nº 5, es apenas opalescente a 67°C . pero se nota una turbidez bien marcada a $69\text{-}70^\circ\text{C}$., comenzando la coagulación a 73°C .

Hacemos el primer ensayo estudiando la termolabilidad de los sueros a 65°C. calentados durante 30 minutos. Damos los valores obtenidos en el cuadro II.

CUADRO 2

SUERO N.º	Aspecto	u. a. antes calentar	u. a. después calentar	Pérdida %
1	muy opalescente	540	462	14,6
2	muy opalescente	540	462	14,6
3	muy opalescente	540	462	14,6
4	opalescente	540	< 25	± 100
5	opalescente	540	< 25	± 100

Se nota ya en esta primera experiencia una diferencia bien marcada entre los sueros proteolizados por una parte y los nativos y concentrados por otra. Los sueros proteolizados, calentados a 65°C. durante 30 minutos pierden sólo el 14,6 % de su valor primitivo; en cambio los sueros nativos y concentrados han perdido prácticamente el 100 % de su valor después del calentamiento en las condiciones que hemos explicado.

Por lo tanto, de acuerdo con este ensayo se observa que los sueros proteolizados son menos termolábiles que los sueros nativos o concentrados. Repetimos la operación anterior, pero calentando los sueros durante una hora a la misma temperatura, a 65°C.; pudimos comprobar que el valor antitóxico de los sueros proteolizados se mantiene aproximadamente en el mismo valor (460 u.a.) que en el ensayo anterior. Después de repetir varias veces esta experimentación se comprobó que calentados hasta una hora a 65°C., la pérdida oscila en un 10-15 % del valor primitivo.

CUADRO 3

SUERO N.º	u. a. 30' a 60° C	u. a. 1 h. a 60° C	u. a. 3 h. a 60° C
1	550	550	550
2	550	550	550
3	550	550	550
4	31	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10

Como control se midió el valor en los sueros 4 y 5, y se observó que habían perdido el 100 % de su valor primitivo, como era de esperar.

A continuación estudiamos la termobilidad de los sueros anteriores pero calentados a 60°C. durante 30 minutos, una hora y 3 horas. En el cuadro III figuran los resultados de este ensayo.

Puede verse que los sueros proteolizados, aún calentados 3 horas a 60°C. no pierden nada de su valor antitóxico, en cambio el suero nativo y el concentrado, calentados 30 minutos a 60°C., pierden prácticamente su valor.

La termoestabilidad es por lo tanto muy superior en los sueros proteolizados.

Como nos interesaba conocer a qué temperatura comenzaba la atenuación en los sueros 4 y 5, hicimos otros ensayos calentándolos a 55°C. durante 30 minutos, 1 hora y tres horas. Pudimos comprobar prácticamente que tanto el suero nativo o el concentrado resistían el calentamiento a 55°C. durante 3 horas. El valor antitóxico se mantiene en 550 u.a.

Teniendo interés este método de coagulación por su posible aplicación en la purificación de sueros proteolizados, ensayamos el calentamiento a 65°C., pero durante tres horas. Como se puede ver en el cuadro IV, si bien la pérdida llega a 25 % de sus unidades se consigue una purificación de 30 %.

CUADRO 4

Suero N.º	Valor inicial u. a.	u. a. después del calentamiento	Pérdida %	u. a./prot. antes cal.	u. a./prot. después cal.
1	540	400	26	15.000	24.100
2	540	400	26	14.400	18.300
3	540	416	23	20.000	25.000

La determinación protéica en este ensayo se hizo por micro-Kjeldahl, y en los tres casos se consigue una buena purificación.

Creemos, por lo tanto, que este procedimiento podría aplicarse para conseguir una ulterior purificación en los sueros ya proteolizados y purificados.

Por último ensayamos la termolabilidad en sueros antidiftéricos concentrados por el método salino, pero con fecha de vencimiento, pues habían sido preparados y envasados hacía 4 años. Se procedió en la forma anterior, dializando y agregando el 5‰ de ClNa, y llevándolos a 540 u.a. por cm³. Calentándolos a 65°C., durante 30 minutos, los dos sueros coagulan. A 60°C., durante 30 minutos sólo se enturbian, pero pierden su valor antitóxico. En cam-

bio, calentados a 55°C., durante 30 y 60 minutos, aún contienen alrededor de 400 u.a. (valor inicial 500 u.a.) Si se calientan tres horas a 55°C., el valor baja a 375 u.a.

Harms (5) en un trabajo recientemente publicado estudia la pérdida del poder antitóxico del suero antidiftérico muy purificado (refinado).

Las condiciones variables fueron: la temperatura, la concentración de proteínas, el pH y la influencia de la substancia conservadora contenida en el suero.

Encuentra que el óptimo de conservación del poder antitóxico se encuentra a pH 5,5-6,0. Poca influencia en la curva de deterioro de la antitoxina tienen la concentración proteica, la substancia conservadora, y las temperaturas estudiadas.

Encuentra que a temperaturas inferiores de 5°C. no pierde nada de su actividad, a temperatura ambiente 5 % en un año y 10 % a 37°C.

CONCLUSIONES

Se ensayó la termolabilidad de tres sueros antidiftéricos proteolizados, de un suero nativo antidiftérico, y por último, tres sueros concentrados por el método salino.

Se nota una diferencia bien marcada entre los sueros proteolizados por una parte y los nativos y concentrados por otra. Los sueros proteolizados calentados a 65°C. durante 30 minutos sólo pierden el 15 % de su valor primitivo, en cambio los sueros nativos y los concentrados pierden todo su valor.

Además se describe en este trabajo la termolabilidad de estos sueros comparativamente en función de la temperatura y tiempo de calentamiento, siendo siempre mucho más termolábiles los sueros concentrados y nativos que los proteolizados.

Por último se aplica este procedimiento para conseguir una ulterior purificación de los sueros proteolizados, con buen resultado.

BIBLIOGRAFÍA

1. UTKIN L. — *Bioch. Zeit.*, **276**, 64, 1933.
2. QUIGLEY J. — *The Amer. Journal of. H.*, **20**, 218, 1934.
3. MODERN F. y RUFF G. — *Rev. Inst. Bact.*, **7**, 610, 1936.
4. MODERN F. y RUFF G. — *Rev. Sociedad Arg. Bio.*, **14**, 102, 1938.
5. HARMS A. J. — *Brit Abstr. A. III*, mayo 1946, 407.