

Purificación y concentración del toxoide tetánico

Por FERNANDO MODERN, GUILLERMO RUFF y
ALEJANDRO GATTI

En un trabajo ya publicado ⁽¹⁾ estudiamos el poder antigénico de la toxina tetánica, el punto isoeléctrico, la diálisis, su mejor transformación en toxoide, óptimo de formol y tiempo de incubación.

Además ensayamos con buen resultado, la adsorción del toxoide en hidrato de aluminio.

Se pudo comprobar entonces, que usada como vacuna en el hombre producía inmunidad y se estudió comparativamente el efecto de una dosis de vacuna activada, con dos dosis de toxoide común, obteniéndose mejor resultado con la primera.

Por su alto poder antigénico y su inocuidad, el toxoide purificado por ácido y adsorbido en gel de aluminio, era una excelente vacuna para uso humano. Sin embargo la técnica para la preparación de la vacuna, era engorrosa y difícil y en muchos casos, si no se dializaba el toxoide previamente, antes de acidificar, las pérdidas llegaban al 70 % y aún más. Éstas fueron las razones por las cuales no se preparó sistemáticamente vacuna antitetánica para uso humano.

Interesados en proseguir estos estudios, iniciamos la búsqueda de algún método práctico, que nos permitiera sin mayor pérdida, obtener un toxoide puro, concentrado, libre de sustancias anafilactogénicas, que sirviera para la preparación de la vacuna. Comenzamos ensayando el método de Pillemer, Grossberg y Wittier ⁽²⁾, quienes purifican el toxoide tetánico, empleando metanol en condiciones determinadas de acidez y a baja temperatura. Lo obtienen al estado anhidro, por liofilización del toxoide congelado. Esta técnica da excelentes valores como se verá más adelante, pero resulta complicada por los dispositivos necesarios que se emplean, y el alto precio del alcohol metílico, en nuestro país. En la actualidad, este método no lo podríamos usar en la rutina, pues los pedidos de vacuna son grandes, principalmente por parte de la "Sanidad Militar".

Pillemer ⁽³⁾ en otro trabajo, estudia el punto óptimo de precipitación del toxoide, en presencia de mezclas de metanol y agua en condiciones controladas de pH y temperatura. H. Mueller y P. Miller ⁽⁴⁾, describen una variante de la cepa del Cl. tetani, que da

una toxina de alto valor, en presencia de cantidades relativamente altas de hierro. Emplea un medio de cultivo parecido al que se usa en el Instituto, con autolizado de estómago de cerdo.

E. Taylor ⁽⁵⁾ usando un medio parecido al anterior, obtiene una buena toxina, que después de transformada en toxoide, da resultados satisfactorios en la vacunación del hombre.

Por el agregado de caseína digerida, Pickett, Hoeprich y Germain ⁽⁶⁾ logran preparar una toxina de alto valor y fácil purificación.

Eaton y Gronau ⁽⁷⁾, purifican la toxina tetánica, por precipitación con cloruro de cadmio y elución en fosfato de sodio a pH 7.8.

ENSAYOS REALIZADOS

Al iniciar este trabajo, tratamos de concentrar al vacío la toxina tetánica, siguiendo el método que empleamos para concentrar el toxoide diftérico ⁽⁸⁾. Se concentró diez veces al vacío, se dializó y midió. Se pudo comprobar, que la toxina tetánica perdía gran parte del valor inicial. En cambio, el toxoide tetánico, se puede concentrar en esta forma manteniendo su valor primitivo.

Pero este toxoide concentrado, tal cual o dializado, sólo precipita la parte activa parcialmente, usando como precipitantes, ácido sulfúrico o ácido acético.

También ensayamos con malos resultados, la precipitación con sulfato de amonio.

Tampoco con alcohol metílico y etílico (en frío) en los toxoides concentrados 10 veces, precipita cuantitativamente la parte activa. El toxoide nativo, sin concentrar, tampoco se pudo purificar por precipitación ácida, pues la pérdida es todavía mayor.

La técnica de Pillemer (con metanol) aplicada a nuestro toxoide concentrado al vacío, da mucha pérdida como se puede ver en el Cuadro I.

CUADRO I
PRECIPITACIÓN DEL TOXOIDE 504, 10 VECES
CONCENTRADO AL VACÍO

pH	Nitrógeno en mg./ml.	D. T./ml.	Pérdida
4,9	0,101	165	67 %
4,5	0,126	100	80 %
4,0	0,196	165	67 %
3,7	0,353	100	80 %
3,4	0,448	100	80 %
Toxoide 504 concentrado.	30,9	500	

Solamente en el toxoide nativo (entre pH 4 y 5) precipitando con alcohol metílico al 40 %, recuperamos el valor inicial. (Ver Cuadro 2).

CUADRO 2
PRECIPITACIÓN DEL TOXOIDE 504 CON ALCOHOL METÍLICO

pH	Nitrógeno en mg./ml.	D. T./ml.	Pérdida	Y de N/D. T.	Purificación (veces)
4,9.....	0,028	50	0	0,56	123
4,55.....	0,063	50	0	1,26	55
4,0.....	0,087	50	0	1,75	39
3,7.....	0,119	33	34 %	3,60	19
3,4.....	0,115	25	50 %	4,60	15
3,1.....	0,084	20	60 %	4,20	16
Toxoide 504.....	3,45	50	—	69,0	—

La mejor purificación se observa a pH 4,9, llegando a dar una purificación de 123 veces, como se puede observar en el cuadro anterior. A medida que se acidifica disminuye el grado de purificación. En el medio de cultivo ensayado, si el toxoide original contiene 15 D. T. (*) (dosis test) por miligramo de nitrógeno, el purificado por el método de Pillemer, da 1.800 D. T., es decir corresponde a una purificación de 123 veces.

Precipitando el toxoide nativo a temperatura ambiente en alcohol metílico o etílico y a pH 4,75, se produce una pérdida muy grande. Esta pérdida se reduce mucho y llega a sólo 10-20 % si se precipita a 0°C., anulándose, si se precipita a temperaturas bajo cero.

Ensayamos también, la posible precipitación del toxoide nativo y concentrado a distintos pH, con acetona en frío, con mediocres resultados.

Como nos interesaba dilucidar a qué era debida esta falta de recuperación en el toxoide concentrado, lo dializamos. Tampoco precipitó cuantitativamente, de manera que esta falta de precipitación, se debía a sustancias de naturaleza coloidal y no a las sales que había sido eliminadas por la diálisis.

Si bien, los resultados obtenidos en la precipitación del toxoide nativo, con metanol (mét. Pillemer) eran buenos, ya que conseguimos una purificación de 123 veces, con respecto al toxoide original,

(*) Una dosis test de toxoide, proviene de una dosis test de toxina que frente a 0.1 unidad antitóxica (americana), mata al cobayo al cuarto día (vía intramuscular) con tétano.

por las razones que indicamos anteriormente, la hacían inapropiadas en nuestro medio. Por otra parte, con el medio de cultivo usado por nosotros, no se consigue una purificación mayor, en el método antes descrito. Sólo se obtuvo en las mejores condiciones 0.56 γ de nitrógeno por D. T.

A pedido del doctor Savino, iniciamos la posible concentración y purificación con alcohol etílico y conseguimos con dos precipitaciones sucesivas, una purificación de 200 veces con respecto al toxoide original, y con un contenido nitrogenado por dosis test, inferior al obtenido por el método anterior.

A continuación, describimos el método que seguimos en el Instituto y otros ensayos, que nos ha dado excelentes resultados, tanto en su purificación final, como en su rendimiento, ya que en la mayor parte de los ensayos y que corresponde al método que hoy usamos en la rutina, no hemos tenido pérdidas. Este método simple, se puede realizar con sólo disponer de alcohol etílico y de una adecuada refrigeración.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se usa peptona Martin, que se prepara por digestión ácida de estómago de cerdo, siguiendo la técnica, en líneas generales, que describe el autor del método. De esta peptona se usa solamente el líquido sobrenadante.

Aparte se prepara agua de carne. A un kilo de carne de ternera limpia y molida, se le agrega dos litros de agua destilada, se hierve 30 minutos y se filtra por papel. Se mezclan partes iguales de agua de carne y peptona Martin, se lleva a pH 7.2 con hidrato de sodio al 20 % y se hierve durante 3 minutos. A este caldo, se le agrega 1 % de glucosa, se filtra y se distribuye en frascos adecuados y se esteriliza dos veces a 100°C. Preparado el caldo se siembra en la sección toxina el Cl. tetani, en la forma habitual y se mide al final el valor de la toxina tetánica.

ATENUACIÓN POR EL FORMOL

Se prepara el toxoide por agregado de formol. Hasta el año 1934, se usaba 1.5 ‰ de formalina y 20 días de incubación a 37°C. Pero a raíz de los ensayos que realizó uno de nosotros (Sordelli, Modern y Ferrari, loc. cit.) y publicado en la Rev. del Instituto en el año 1936, se usó desde entonces 6 ‰ de formol a pH 7, y sólo 5 días de incubación, a 37°C. En esta forma se conseguía la desintoxicación total de la toxina tetánica y los sueros obtenidos en la inmunización de los caballos daban un valor antitóxico mucho más elevado.

PURIFICACIÓN DEL TOXOIDE Y SU CONCENTRACIÓN

Se concentran partidas correspondientes a 22.4 litros de toxoide nativo. El toxoide se lleva a pH 4.7 - 4.8, con H_2SO_4 , 5 N. Se colocan los frascos en baño refrigerante a $-14^{\circ}C$. Después de una hora cuando se ha producido una congelación parcial del toxoide, se agregan 16 litros de alcohol etílico (96%) a $-10^{\circ}C$. de temperatura, agitando continuamente. Se deja en el baño refrigerante hasta el día siguiente, filtrándolo luego por papel plegado en cámara fría. El precipitado se disuelve cuantitativamente, y se lleva a 2240 cm^3 . y a pH 7.0-7.2, con hidrato de sodio.

Luego se vuelve a precipitar con 40 % de alcohol etílico y a pH 4.5-4.8, cuidando la temperatura como en la primera precipitación. Como en el ensayo anterior se deja en el baño a $-14^{\circ}C$., durante la noche y luego se filtra en cámara fría. El precipitado, se disuelve a pH 7.0-7.2, se filtra y se le añade 1/5000 de merthiolate (mercuri-tiosalicilato de sodio etílico), como conservador. Una vez medido el toxoide, se filtra por filtro Seitz y se agrega el hidrato de aluminio, en la forma que describimos a continuación.

PREPARACIÓN Y FILTRACIÓN DE LA VACUNA

La vacuna contendrá 60 D. T. por cm^3 . y el gel correspondiente. Usamos como sustancia conservadora el merthiolate en la concentración de 1/5000. La dilución del toxoide se hará en solución de cloruro de sodio estéril al 5 ‰. El toxoide diluido deberá estar a pH 5.5, una débil opalescencia se produce y corresponde al máximo de adsorción, para el gel en cuestión. Se agregará el ácido necesario, para llevarlo a este pH después de filtrarlo por filtro Seitz. Por ejemplo, 15.8 litros de toxoide (60 DT/ cm^3 .) * deberán contener 820 cm^3 . de gel (10 mgr. de hidrato de aluminio por cm^3 .). Ese gel se preparará siguiendo la técnica descrita por nosotros (loc. cit.), en los trabajos sobre toxoide diftérico. Envasada la vacuna, se harán los controles de esterilidad, inocuidad y poder vacunante, que describimos más adelante.

ACTIVIDAD DEL TOXOIDE

Para determinar la actividad del toxoide empleamos los siguientes métodos: 1^o La elevación en el valor antitóxico del suero de cobayos inyectados con el toxoide. 2^o La neutralización de la antitoxina por

* Ensayos posteriores, indicarán la dosis conveniente, para la vacunación humana.

el toxoide (in vivo) y 3º La protección que adquieren los cobayos inyectados con la vacuna, después de un tiempo, a la inoculación de 1 D. T. de toxina tetánica (vía subcutánea).

El primer método, consiste en inyectar por lo menos 4 cobayos con una dosis de vacuna (vía subcutánea) con el gel correspondiente y a las 6 semanas, determinar el valor antitóxico, en los sueros de los cobayos (500 gr. cada uno). Deberán dar alrededor de una unidad antitóxica (americana).

El segundo método, que se usa corrientemente en el Instituto, consiste en colocar dosis variables de toxoide, en presencia de 0.1 u. a. de suero antitetánico y llevarlo a igual volumen con solución fisiológica. A la media hora, se agrega a cada tubo, $\frac{1}{2}$ dosis test de toxina tetánica. Se deja otra media hora y luego se inyectan los cobayos por vía intramuscular. Se toma como valor, el cobayo que muere al cuarto día con tétano. Aunque este método es de uso corriente, damos un ejemplo de la forma cómo hemos calculado la dosis test (D. T.) de nuestros toxoides en este trabajo, quedando así bien aclaradas y fijadas las condiciones. Si el cobayo muere con 0.1 cm³. de un toxoide diluido al 1/10, el número doble ($\frac{1}{2}$ dosis test) es 0.2 de la dilución al 1/10. Es decir, que en 0.02 cm³. del toxoide hay una dosis test, y corresponde por lo tanto a 50 dosis por cm³.

Este método, da excelentes resultados y lo usamos preferentemente, hasta tanto podamos medir por floculación, todos los toxoides, lo que ya está en vías de realización.

El tercer método, sólo se usó, para conocer el poder vacunante de la vacuna ya envasada. Usamos 10 cobayos de 500 gr. a los que inyectamos, una dosis de vacuna. A las 6 semanas, se le inyectan 1 D. T. de toxina. Deben sobrevivir, a esta última inyección el 100 % de los animales. Hemos llegado a inyectar hasta 2 D. T. y sobreviven el 100 % de los cobayos (vía subcutánea). Los controles sin vacuna (con 0.1 D. T.), deben morir antes de las 48 horas.

De acuerdo al "Dispensatory", sólo es necesario inyectarles 10 d.m.m. de toxina, y se considera buena vacuna, si protege al 80 % de los animales.

Como se puede ver, sólo usan 10 d. m. m. de toxina, pero nosotros empleando 1 D. T. y 2 D. T. obtenemos una protección del 100 %. Este gran poder vacunante lo atribuimos a la forma de desintoxicar nuestra toxina.

Los ensayos de inocuidad, se hicieron con 5 cm³. de toxoide para cada cobayo. Se emplearon por lo menos 4 cobayos, en cada determinación y se controló el peso de los animales, durante 4 semanas. Estas determinaciones, se hicieron con el toxoide, antes de concentrar y después de preparada la vacuna.

Se midió el nitrógeno por Kjeldahl, pudiéndose así calcular el grado de purificación obtenido.

Las determinaciones de pH, se hicieron potenciométricamente con electrodo de vidrio.

PURIFICACIÓN DE LOS TOXOIDES

Comenzamos ensayando el toxoide N° 512, siguiendo la técnica que indicamos en otro lugar. Pero por inconvenientes en el refrigerador, la temperatura subió varios grados sobre cero durante la noche. En esta forma si bien se precipita el toxoide, la purificación es menor. Después de precipitar por el alcohol, el toxoide contenía 0.72 mgr. de nitrógeno por cm^3 . Y como el original contenía, 3.33 mgr. de nitrógeno por cm^3 , se había conseguido una purificación de 46 veces. Por una segunda precipitación por alcohol, aún haciéndolo a baja temperatura, se llegaba a 0.39 mgr. de nitrógeno por cm^3 . La purificación total obtenida con este toxoide, era de 86 veces.

En otra experiencia y trabajando de nuevo con 11.2 litros de toxoide (N° 509) pero regulando bien la temperatura, en la primera precipitación alcohólica, ya se consiguió una purificación de 80 veces.

El toxoide nativo contenía 50 D. T. por cm^3 .

Por una segunda precipitación con alcohol etílico, se llega a una purificación de 269 veces, con sólo una pérdida del 10 % con respecto al valor primitivo. Este toxoide purificado, pero por una sola precipitación con alcohol etílico, se lo sometió a una segunda precipitación con alcohol metílico y se obtuvo así un toxoide con 0.168 mgr. de N por cm^3 , es decir, una purificación de 209 veces. El empleo de estos dos alcoholes combinados, no es mejor por lo tanto. En una sola precipitación con alcohol metílico se purifica 66 veces el toxoide primitivo. Nuestros toxoides por lo tanto, preparados con un medio de cultivo distinto, se purifican mejor con alcohol etílico, que con alcohol metílico.

A continuación, en el Cuadro 3, describimos los ensayos realizados con dos concentraciones de alcohol etílico y otros ensayos combinados con ácidos.

Si al toxoide purificado por alcohol etílico, lo sometemos a una segunda purificación, llevándolo a su punto isocelétrico con H_2SO_4 , conseguimos una purificación de 312 veces (ver Cuadro 3) con una pérdida del 50 % de su valor. Esta es la mejor purificación obtenida, pero con una pérdida relativamente elevada.

Con ácido acético, la purificación no mejora. Se llega a 200 veces, con una pérdida del 60 %, del valor inicial. Con estos ácidos, no se mejora la purificación partiendo del toxoide purificado, por dos concentraciones con alcohol etílico. Se obtienen valores muy pareci-

dos, para el ácido sulfúrico, 222 veces, y para el ácido acético 250 veces (Cuadro 3).

Por dos precipitaciones con alcohol etílico, conseguimos un toxoide que contiene 0.26 γ de nitrógeno por D. T. Con ácido sulfúrico, una purificación algo mejor (0.22 γ por D. T.), pero con una pérdida del 50 %. Partiendo de la segunda concentración por alcohol, ya no es posible mejorar la relación de purificación por ácidos (N/D. T.).

CUADRO 3
REPRECIPITACIÓN DEL TOXOIDE PURIFICADO
Y CONCENTRADO POR ALCOHOL

	mg/N/ml.	D. T./ml.	γ N/D. T.	Pérdida %	PURIFICACIÓN	
					Con relación a la alcohólica	Total
Toxoide nativo	3,508	50	70,1	—	—	—
1. ^a . Precipitación con alcohol etílico	0,435	500	0,87	0	—	80
1. ^a . Precipitación con alcohol etílico más 1 precipitación con $SO_4^{+} H^+$	0,056	250	0,224	50	3,8	312
1. ^a . Precipitación alcohólica más una precipitación con ac. acético	0,070	200	0,35	60	2,5	200
2. ^a . Precipitación alcohólica	0,119	450	0,264	10	3,3	269
2. ^a . Precipitación alcohólica más 1 precipitación con ácido sulfúrico	0,063	200	0,315	60	0,84	222
2. ^a . Precipitación alcohólica más una precipitación con ácido acético	0,056	200	0,28	60	0,94	250

En la actualidad, hacemos ensayos tendientes a reducir esta pérdida, que se produce en la precipitación con ácidos.

A continuación, ensayamos la purificación en mayor escala, empleando el método de la concentración del toxoide por dos precipitaciones con alcohol. Trabajando en buenas condiciones, cuidando bien la temperatura, este método permite una purificación de más de 200 veces y una pérdida que no es mayor del 10 %. Naturalmente estos valores se obtienen si partimos de un buen toxoide, que tenga por lo menos 50 D. T. por cm^3 .

Este toxoide así purificado, se emplea ya en la preparación de la vacuna antitetánica con éxito; y cada operación se hace con 22.4 lts. de toxoide nativo y da aproximadamente 15.000 dosis de vacuna activada, con gel de aluminio (vacuna en ensayo).

En el Cuadro 4, damos los valores obtenidos en una serie de concentraciones, por dos precipitaciones con alcohol, y los valores de purificación obtenidos. Sólo en un caso, se obtuvieron mediceros resultados en un toxoide de más de un año y con menos de 25 D. T. por cm^3 .

CUADRO 4
DOS PURIFICACIONES CON ALCOHOL ETÍLICO

TOXOIDE	mg. N/ml.	D. T./ml.	γ N/D. T.	Purificación (veces)	Pérdida %
515 (nativo)	2,83	50	56,5	—	—
1. ^a purificación alcohol	0,294	500	0,59	95	0
2. ^a purificación alcohol	0,124	500	0,25	226	0
518 (nativo)	3,29	50	65,8	—	—
1. ^a purificación alcohol	0,38	500	0,76	86	0
2. ^a purificación alcohol	0,164	500	0,328	200	0
Toxoide viejo (más de un año)	3,36	21	160	—	—
1. ^a purificación alcohol	0,65	208	3,1	51	0
2. ^a purificación alcohol	0,19	208	0,9	177	0
3. ^a purificación alcohol	0,27	415	0,65	246	0
519 (nativo)	3,31	50	67	—	—
1. ^a purificación alcohol	0,325	500	0,65	103	0
2. ^a purificación alcohol	0,168	600 *	0,28	239	0
520 (nativo)	3,39	50	67,7	—	—
1. ^a purificación	0,357	450	0,79	85	10
2. ^a purificación	0,164	450	0,36	188	10

* Se concentró doce veces.

Como se puede ver en este cuadro, la purificación final, después de la segunda precipitación alcohólica, llega casi siempre a 200 veces. Sólo un toxoide ya envejecido y que seguramente había perdido parte de su valor inicial, dió una purificación de 177 veces y con un contenido nitrogenado de 0.90 γ por dosis test. Los buenos toxoides, después de la primera precipitación con alcohol, contienen 0.60 γ a 0.70 γ de nitrógeno por dosis test.

Después de la segunda precipitación con alcohol etílico, pasan a un valor que oscila entre 0.25 γ y 0.32 γ de nitrógeno por dosis test.

Los toxoides tetánicos nativos, contienen alrededor de 65 γ de nitrógeno por dosis test. En la mayor parte de los casos la purificación sobrepasa las 200 veces.

En todas estas concentraciones que se hicieron sistemáticamente, no se observan pérdidas.

El toxoide de poco valor inicial, que contenía 160 γ de nitrógeno por dosis test, después de la segunda precipitación alcohólica, daba

0.90 γ de nitrógeno. Sometido a una tercera precipitación daba 0.65 γ de nitrógeno por dosis de test. Contenía 415 dosis test por cm^3 , y medido por floculación daba 41,7 Lf por cm^3 . En este caso dos litros correspondientes a la segunda precipitación, se llevaron después de la tercera sólo a un litro. Esto nos indica que es preciso partir siempre de buenos toxoides, para lograr finalmente un toxoide concentrado que contenga alrededor de 0.3 γ por dosis test. Aún con una tercera precipitación alcohólica, de un toxoide de bajo valor inicial, los resultados no mejoran a los obtenidos con dos precipitaciones alcohólicas de un toxoide que contenga 50 dosis test por centímetro cúbico.

Si bien en este caso se alcanzó una purificación de 246 veces, el contenido nitrogenado era de 0.65 γ por dosis test. Con los buenos toxoides, alcanzando una purificación de 200 veces, el contenido nitrogenado no es mayor de 0.30-0.32 γ por dosis test.

La vacuna preparada con estos toxoides y con el agregado de gel de aluminio, da excelentes resultados en los cobayos: Con 30 D. T., encontramos en los sueros de los cobayos a las 6 semanas, 0.5 u. a. Con 60 D. T. y 120 D. T. el valor está comprendido entre 0.5 y 1 u. a. Los cobayos vacunados con 30-60 y 120 D. T. y gel, tienen gran valor antigénico, pues resisten la inyección de 2 D. T. de toxina, sin presentar síntomas de tétano. Los controles sin vacuna, mueren antes de las 48 horas por la inyección de 0.1 D. T. de toxina (vía subcutánea).

RESUMEN

Se estudia la concentración al vacío del toxoide tetánico, comprobándose que conserva el valor primitivo. Pero este toxoide así concentrado y dializado, por las sustancias de naturaleza coloidal que contiene, no precipita bien ni por los ácidos ni por los alcoholes estudiados.

El toxoide nativo, sin concentrar tampoco se puede purificar por precipitación ácida, pues la pérdida llega a dar más del 70 % del valor primitivo. Sólo dializando el toxoide nativo previamente, esta pérdida se reduce al 50 % del valor primitivo.

La técnica de Pillemer (con metanol), aplicada a nuestro toxoide concentrado al vacío, da mucha pérdida (de 60 a 80 %).

Con toxoide nativo, esta técnica da buenos resultados, llegándose a obtener una purificación de 123 veces. Sin embargo, este método no es apropiado al medio de cultivo usado por nosotros, ya que usando otra técnica, pudimos llegar a una purificación mayor.

Hemos obtenido buenos resultados con dos precipitaciones sucesivas con alcohol etílico, a baja temperatura, o también combinando

la precipitación con alcohol y luego ácido en condiciones determinadas. Se describe también en este trabajo la preparación del medio de cultivo usado, la atenuación por el formol, la purificación del toxoide y la preparación de la vacuna. Además se dan los métodos usados para determinar la actividad del toxoide.

Si al toxoide purificado, por precipitación con alcohol etílico, lo sometemos a una segunda purificación, llevándolo a su punto isoelectrico con H_2SO_4 , conseguimos una purificación de 312 veces (Cuadro 3) con una pérdida del 50 % de su valor inicial. No se disminuye esta pérdida, usando un ácido orgánico como precipitante.

Terminamos este trabajo, dando los resultados obtenidos en la concentración y purificación del toxoide por dos precipitaciones sucesivas con alcohol etílico, a baja temperatura.

En esta forma, concentramos los toxoides, sin pérdidas en su valor y con una purificación que en la mayor parte de los casos, sobrepasa las 200 veces. Este es un buen toxoide para la preparación de la vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) A. SORDELLI, F. MODERN y J. FERRARI: *Rev. Inst. Bact.* Vol. VII, pág. 622, año 1936.
- (2) L. PILLEMER, D. B. GROSBURG y R. WITTLER: *The J. of Immunol.* Vol. 54, N.º 3, pág. 213, año 1946.
- (3) L. PILLEMER: *The J. of Immunol.* Vol. 53, pág. 377, año 1946.
- (4) J. H. MUELLER y P. A. MILLER: *The J. of Immunol.* Vol. 50, pág. 377, año 1945.
- (5) E. TAYLOR: *The J. of Immunol.* Vol. 50, pág. 385, año 1945.
- (6) CH. J. PICKETT, P. D. HOEPRICH y R. O. GERMAIN: *J. Bact.* Vol. 49, pág. N.º 515, año 1945.
- (7) EATON y GRONAU: *J. Bact.* Vol. 46, pág. 423, año 1945.
- (8) F. MODERN, G. RUFF y A. GATTI: *Anales As. Química Arg.* Vol. 35, pág. 178, año 1947.