TOXOIDE DIFTERICO

a) SU CONCENTRACION Y PURIFICACION (2ª comunicación).

b) PREPARACION DE LA VACUNA Y SU PODER VACUNANTE.

por Fernando Modern, Guillermo Ruff y Alejandro Gatti

---

a) Primera parte. — CONCENTRACION Y PURIFICACION DE TOXOIDE DIFTERICO.

La producción de una buena toxina diftérica, fué una preocupación que se tuvo en el Instituto desde hace mucho tiempo. Muchos trabajos se han publicado aquí y en el extranjero, tratando de obtener una toxina con el mayor número de unidades posibles (Lf). Con este objeto se cambiaron los constituyentes del caldo repetidas veces, y nosotros, (1) publicamos un nuevo medio para la obtención del toxoide, que resultara práctico y económico y de fácil realización en el Instituto. Tuvimos en cuenta para la preparación de este medio, las investigaciones de Pappenheimer y las de Mueller, que trabajan con substancias de composición química bien definidas y simples, (loc. cit.). El medio de cultivo dá en pocos días de incubación de 50 a 80 Lf. por centímetro cúbico. Este medio no se ha usado mayormente en la rutina porque demanda un procedimiento muy complicado para eliminar el hierro, sin lo cual no da el valor anteriormente indicado.

Para que el costo de la toxina fuera bajo, preparamos la peptona y la maltosa que nos dieron excelentes resultados. Por otra parte el toxoide era de fácil purificación y relativamente puro después de precipitarlo en el punto isoeléctrico. Esta purificación la estudiaron Sordelli, Savino y Ferrari, (2) llegando a la conclusión que este toxoide purificado y activado reúne las condiciones de una buena vacuna.

Como el problema de la obtención de un toxoide de gran pureza tiene mucha importancia de acuerdo con las observaciones de Pope y Linggood, (3) ya que se usa en gran escala en la vacunación antidif-

---

Presentado en la reunión de comunicaciones del 22 de abril de 1947.

térica, nos propusimos proseguir la posible purificación y llegar a valores próximos a los obtenidos por Pappenheimer (0.00046 mg. de nitrógeno por Lf) (4) (5). El método descripto por este autor para llegar a esa purificación en la toxina diftérica, demanda operaciones largas (precipitación con sulfato de amonio, diálisis, etc.) que lo hacen poco apto para concentrar grandes cantidades de toxoide.

También Eaton (6) consigue una toxina muy pura que tiene 0.0005 mg. de N por Lf, precipitándola con sulfato de aluminio y amonio, y luego por cloruro de cadmio. En el año 1942, los Dres. I y R. R. de Pirosky (7) estudian la purificación del toxoide diftérico obtenido en medio simplificado, llegando a un valor de 0.56 γ de nitrógeno por Lf, con un rendimiento del 50 % del valor primitivo. Precipitan el toxoide en el punto isoeléctrico y luego lo tratan con sulfato de amonio al 1/3 de saturación.

Nosotros en un trabajo recientemente presentado (9) describimos una nueva técnica que consiste en concentrar al vacío (10 veces) el toxoide antes de precipitarlo en el punto isoeléctrico, En esta forma se reducía la pérdida notablemente, pero sólo se conseguía una pureza de 2 a 3 γ de nitrógeno por Lf. Solamente por una segunda precipitación se llegaba a valores aceptables de pureza. También por diálisis del concentrado y luego precipitación, conseguíamos un toxoide que contenía 0.75 γ de nitrógeno por Lf. En este trabajo, completamos la técnica antes descripta, y por simple lavado del precipitado con mezclas buffer (pH 4. 0) conseguimos un toxoide purísimo.

También estudiamos la eliminación del colorante que acompaña al toxoide concentrado, consiguiendo separarlo por lavado con alcohol.

Por estos procedimientos, como se puede ver, el poder vacunante del toxoide se mantiene íntegramente.

CONCENTRACIÓN DE TOXOIDES POR PRECIPITACIÓN.

Los toxoides se precipitan a pH 3.5 - 3.6, dejándolos en reposo 2 horas, luego se centrifugan. El precipitado se disuelve con Na OH hasta alcanzar un pH de 7.2 a 7.4. El volumen se lleva a la décima parte del volumen original.

En la primera columna donde dice, "Toxoide Instituto", queremos significar que el toxoide ha sido preparado con peptona elaborada por nosotros, de acuerdo con la técnica descrita en otro trabajo. En otros casos agregamos a este toxoide, el 20 % de otro toxoide preparado con peptona Parke Davis (P. D.). Por último, en otros ensayos para ayudar la precipitación, se agregó el 10 % de Cl Na. Como se puede ver analizando el cuadro I, las pérdidas son elevadas. Por el agregado de toxoide preparado con peptona Parke Davis, se pudo en muchos casos disminuir las pérdidas. En general, el agregado de Cl Na. también las disminuye. Todos estos procedimientos dan una disminución grande.

El toxoide preparado con peptona del instituto, dá una pérdida promedial del 60 %; agregando a este mismo toxoide el 20 % de un toxoide preparado con Peptona Parke Davis, la pérdida se reduce a la mitad. Por el agregado del 10 % del Cl Na, antes de precipitar se llega al 28 % de disminución.

Como se puede ver más adelante en este trabajo, hemos conseguido disminuir esta pérdida, y hacerla no mayor del 20 % si concentramos al vacío, a baja temperatura el toxoide nativo, y luego lo precipitamos. El precipitado contiene muchas impurezas que se eliminan por precipitaciones sucesivas como se verá más adelante. Este procedimiento tiene una ventaja grande sobre el anterior, desde el punto de vista económico.

Por precipitación, los toxoides recién preparados (de menos de un mes) dan menos pérdidas, que los que han permanecido 6 meses a temperatura ambiente, como se puede ver en los cuadros I y II. Con cualquier procedimiento que se emplee conviene elaborar los toxoides inmediatamente, para reducir al mínimo la pérdida en Lf por atenuación.

CUADRO I

TOXOIDES	Lf / cm³.	Concentrado 10 veces; Lf/cm³.	Pérdidas
Instituto + 20 % P. D.	28 Lf 1 Lf = 144 γ N	200 Lf 1 Lf = 1.42 γ N	28.6 %
Instituto N.° 1593	32 Lf	100 Lf	68.8 %
Instituto N.° 1613	20 Lf	50 Lf	75 %
Instituto + 20 % P. D.	30 Lf 1 Lf = 128 γ N	164 Lf 1 Lf = 1.7 γ N	45.3 %
Instituto N.° 1629	21 Lf	77 Lf	63.3 %
Instituto + 20 % P. D.	23 Lf	150 Lf	34.8 %
Instituto + 10 % Cl Na	20 Lf	100 Lf	50 %
Instituto N.° 1630	20 Lf	50 Lf	75 %
Instituto + 20 % P. D.	20 Lf	160 Lf	20 %
Instituto N.° 1630+10% ClNa	20 Lf	160 Lf	20 %
Toxoide Instituto de 30 días	28 Lf	180 Lf	35.7 %
El anterior + 20 % P. D. ..	28 Lf	220 Lf	21.5 %
El anterior + 10 % de Cl Na	28 Lf	200 Lf	28.6 %
Toxoide Instituto de 25 días, (1639)	28 Lf	180 Lf	35,7 %
El anterior + 20 % P. D. ..	28 Lf	220 Lf	21.5 %
El anterior + 10 % de Cl Na	28 Lf	200 Lf	28.6 %
Toxoide Instituto 1648	30 Lf	100 Lf	66 %
El anterior + 10 % de Cl Na	30 Lf	263 Lf	12.4 %
El anterior + 20 % P. D. ..	30 Lf	217 Lf	27.7 %
Toxoide Instituto 1649	30 Lf	100 Lf	66 %
El anterior + 10 % Cl Na ..	30 Lf	217 Lf	27.7 %
El anterior + 20 % P. D. ..	30 Lf	200 Lf	33.3 %

PRECIPITACIÓN DE TOXOIDES RECIÉN PREPARADOS

La transformación de toxina a toxoide, se practicó en la forma habitual. Se comprobó al cabo de 30 días de estufa, que los toxoides eran sumamente alcalinos (pH 8.2 - 8.3). Una parte de estos toxoides se dejó a ese pH, y otra se llevó a pH 7.8 - 7.9 con ácido clorhídrico, y 10 días después se precipitan en la forma anterior. El resultado de las experiencias se dan a continuación, en el cuadro Nº II.

CUADRO II

TOXOIDE	Lf/cm³.	Precipitac. (pH)	Conc. 10 veces	Pérdidas
1652 pH 7.8	43.5	3.5	179	58.8 %
El anterior + 20 % P. D.	41.6	3.6	280	32.7 %
El anterior + 10 % Cl Na	43.5	3.4	400	8 %
1652 pH 8.2	43.5	3,5	192	55.8 %
El anterior + 20 % P. D.	41.6	3.6	280	32.7 %
El anterior + 10 % Cl Na	43.5	3.4	400	8 %
1653 pH 7.8	50	3.55	250	50 %
El anterior + 20 % P. D.	45	3.60	280	37.8 %
El anterior + 10 % Cl Na	50	3.40	400	20 %
1653 pH 8.3	45.5	3.55	250	45 %
El anterior + 20 % P. D.	41.6	3.60	300	28 %
El anterior + 10 % Cl Na	50	3.40	400	20 %
1654 pH 7.9	50	3.50	179	64 %
El anterior + 20 % P. D.	38.5	3.65	230	40 %
El anterior + 10 % Cl Na	50	3.55	385	7.5 %
1654 pH 8.2	50	3.60	179	64 %
El anterior + 20 % P. D.	38.5	3.60	230	40 %
El anterior + 10 % Cl Na	50	3.55	385	7.5 %

Como se vé en el cuadro número II, poco influye el hecho, de que el toxoide se encuentra a pH 7.9 ó a pH 8.2 para su precipitación.

Se puede observar que precipitando el toxoide tal cual, la pérdida se eleva al 55 - 60 % del valor original. Si la precipitación se hace en presencia de peptona Parke Davis (20 %) la pérdida se reduce al 30 - 35 %. En presencia de Cl Na. al 10 %, la pérdida es aun menor. Se nota especialmente una diferencia marcada entre los toxoides nuevos y los viejos, en la recuperación con Cl Na. al 10 %. En los toxoides recién preparados se pierde el 12 % del valor inicial, en cambio en los toxoides viejos estas pérdidas llegan al 28 % en las mismas condiciones experimentales.

PURIFICACIÓN DEL TOXOIDE POR CONCENTRACIÓN PREVIA AL VACÍO

Técnica seguida: 3 litros de toxoide (peptona Instituto) que contiene un 20 % de toxoide preparado con peptona Parke Davis, se lleva a pH 7.2 y se concentra al vacío hasta alcanzar a reducir el volumen a 300 cm³.

El toxoide original contenía 4.06 mgr. de N en 20 Lf (1 cm_3). Es decir que correspondía a 203 γ de N por L f.

El toxoide una vez concentrado 10 veces, daba 200 Lf/cm_3 y contenía 37.4 mgr. de N en igual volumen. Correspondía por lo tanto, cada Lf a 187.5 γ de N.

En el toxoide concentrado al vacío, se produce generalmente un ligero precipitado, esto explicaría por qué el concentrado 10 veces, no contenía 10 veces más de nitrógeno (precipitación de substancias inactivas). De este concentrado, se precipitan 100 cm_3 a pH 3.5, a las dos horas se centrifuga y el precipitado se disuelve a pH 7.2, en 100 cm^3 de agua. El toxoide así purificado contiene por Lf. 4.8 γ de N y dió una pérdida del 29 % del valor original. Como esta purificación es pobre, se hace un nuevo ensayo, con otros 100 cm_3 del toxoide concentrado al vacío. Se precipita en la forma anterior, pero el precipitado se lava en el mismo tubo de centrífuga con 100 cm_3 de mezcla buffer a pH 4. Se lleva a igual volumen como en el caso anterior, disolviendo el precipitado en 100 cm_3 de agua a pH 7.2. La pérdida es la misma (29 %) pero cada Lf contiene sólo 0.79 γ de N. Como se vé, lavando el precipitado se elimina una gran parte del nitrógeno presente y se llega a la misma purificación que la que se alcanza por precipitación del toxoide nativo, redisolución del precipitado y una nueva precipitación.

En el método que se usa actualmente, el toxoide nativo se precipita a pH 3,7 y para 100 litros de toxoide se utilizan 10 papeles más o menos, para separar el precipitado.

Ensayamos lavar con mezcla buffer un papel de filtro antes de disolver el precipitado, y pudimos comprobar que un toxoide que daba 1.50 γ de N por Lf. por el simple lavado del papel con mezcla buffer pasa a 0.96 γ de N.

Si este toxoide se precipita a pH 3.8 - 4.0 dá un valor de 0.69 γ de N, que es el valor normal, obtenido en estos ensayos, para un toxoide bien purificado. Sólo se obtiene en esta segunda purificación una pérdida de 5 % en los Lf.

Una tercera precipitación no mejora la relación entre los Lf. y el nitrógeno presente, pues nos dió un valor de 0.70 γ de N por Lf y una pérdida del 10.3 % del valor anterior.

Se trató de purificar el toxoide que actualmente se usa en la preparación de la vacuna antidiftérica.

Ensayamos el toxoide terminado, que contenía 295 Lf/cm3, y con un contenido de 1.49 γ de N por Lf. Le hicimos una segunda precipitación a pH 4 y el precipitado fué redisuelto llevándolo a su volumen original y a pH 7.2. En esta forma con sólo una pérdida del 10.5 % se obtuvo una gran purificación, pues contenía por Lf. 0.66 γ de N, es decir que pasamos de 1.48 γ a 0.66 γ de N/Lf. Este valor se habría alcanzado también si los papeles de filtro se hubieran lavado con mezcla buffer (pH 4) antes de redisolver el precipitado. Repetimos el ensayo anterior, pero lavando el precipitado con mezcla

buffer, pero la purificación no mejoró, ya que nos dió 0,67 γ de N por Lf. Por lo tanto en estas condiciones experimentales, no es necesario lavar el precipitado con mezcla buffer. En cambio, si partimos de un toxoide concentrado al vacío, se hace necesario este lavado. Por lo tanto la llamada purificación consiste en la eliminación por lavado con mezcla buffer del nitrógeno adsorbido por el papel del filtro o por el precipitado mismo.

A continuación en el cuadro III, damos los resultados obtenidos en la concentración al vacío de 4 toxoides diferentes, y donde se puede ver que los valores de purificación son prácticamente iguales.

CUADRO III

Toxoides	10 veces concentrado L /cm³.	Primera redisolución	Redisolución después de lavado con mezcla buffer
1649	300 Lf	250 Lf 1 Lf = 3.75 γ de N	217 Lf, 1Lf = 0.76 γ de N
1654	416	—	385 Lf, 1Lf = 0.75 γ de N
1653	470 Lf	—	416 Lf, 1Lf = 0.75 γ de N
1652	470 Lf	—	416 Lf, 1Lf = 0 64 γ de N

Por el lavado con mezcla buffer del precipitado, se consiguen eliminar las sustancias nitrogenadas retenidas, llegándose a una pureza muy buena y a un valor muy constante. Como dato comparativo debemos hacer notar que Pappenheimer, en una toxina cristalizada encuentra 0.5 γ de N por Lf, y la considera pura y libre de sustancias extrañas. Por lo tanto podemos decir que estos métodos nos aproximan al toxoide muy purificado, ya que no hay razón para suponer que existan diferencias entre toxinas y toxoides con respecto al nitrógeno y a los Lf presentes. Ejemplo: un toxoide cuyo valor original era de 20 Lf/cm3, y que contenía 190 γ de N por Lf, lo concentramos al vacío 10 veces con sólo una pérdida del 9 %. Luego se precipitó y el precipitado se redisolvió, encontrándose como era de suponer, un valor alto en el N (1 Lf = 6.6 γ de N) y en este caso la pérdida fué elevada llegando al 26 %.

Si lavamos el precipitado con mezcla buffer, antes de su redisolución se llega a 0.88 γ de N por Lf con la misma pérdida.

Por precipitación, lavado con buffer y redisoluciones sucesivas (hasta 3) ya no se consigue purificar más el toxoide, pues se llega a un valor que no es menor de 0.76 γ de N.

La sección vacunas nos entregó un papel de filtro con el precipitado correspondiente, hecho según la técnica que está actualmente en uso. Este papel se lavó dos veces con 200 cm.3 de buffer a pH 3.7 y el precipitado se disolvió en 400 cm.3 de agua a pH 7.2. Se consiguió un toxoide que contenía 0.78 γ de N por Lf. Reprecipitando dos veces más, se llegó a 0,76 γ de N por Lf. Por lo tanto, puede com-

probarse que no se purifica más después del primer lavado con mezcla buffer. Este toxoide dió concentrado por rutina 1.4 γ de N por Lf. Por precipitación y redisolución baja este valor a 0.67 γ de N. Lavando con mezcla buffer antes de redisolver el precipitado no mejora el valor (0.72 γ de N). Por lo tanto, se vé que sólo es efectivo el lavado con mezcla buffer cuando esta operación se hace después de precipitar el toxoide nativo, es decir, cuando el papel está impregnado del medio de cultivo primitivo, arrastrándolo la mezcla buffer. También tiene acción eficaz, cuando se trata del toxoide concentrado al vacío, por la misma razón anterior.

Eliminadas todas estas sustancias, ya no es posible una purificación ulterior. La pureza obtenida en nuestros toxoides, por todos estos procedimientos, es prácticamente la misma, lo que es un índice de su pureza.

Como se pudo comprobar, el toxoide purificado actualmente en uso, contiene cierta cantidad del caldo que se utilizó en su preparación. La precipitación del toxoide en su punto isoeléctrico, arrastra algo del medio que después queda en las Lf recuperadas, cosa que se demuestra por estudio comparativo del contenido nitrogenado.

Desde el momento que el medio de cultivo primitivo, tiene propiedades anafilactogénicas, como lo demostraron L. Pillmer y colaboradores (8) para la vacuna tetánica, *conviene eliminar totalmente de la vacuna antidiftérica, el caldo proveniente de su preparación.* Estos autores encuentran que los toxoides tetánicos por ellos purificados, no dan shock en cobayas sensibilizadas, con el medio de cultivo empleado, por lo tanto estan relativamente libres de propiedades anafilácticas.

Actualmente nosotros estamos tratando de determinar la presencia de sustancias anafilactogénicas, provenientes del caldo para la vacuna que es objeto de nuestro estudio.

CONCENTRACIÓN AL VACÍO DE DIFERENTES TOXOIDES

A continuación damos los valores que encontramos en el estudio sistemático de diferentes tipos de toxoides, las pérdidas y la purificación.

En sólo tres casos obtuvimos una pérdida apreciable que llegaba a casi el 30 % del valor primitivo (cuadro IV). En los otros casos la pérdida no fué mayor del 11.5 %, valor que es muy pequeño. Por el procedimiento actual, la pérdida es en muchos casos mayor del 50 % del valor original.

La pérdida alta seguramente se debió a que el concentrado 10 veces antes de precipitar se mantuvo en la heladera varios días, separándose un precipitado cristalino que se pegó a las paredes y que no se pudo desprender ni disolver.

CUADRO IV

Toxoides	Nativo	Concentrado 10 veces (Lf)	Pérdida por concent. al vacío	Primera redisolución	Lavado con buffer y redisolución	Pérdida por precipitac.
Toxoide Inst. +20 % PD	20 (1 Lf = 203 γ)	200 (1 Lf = 187 γ)	0	142 Lf (1 Lf = 4.33 γ)	142 Lf (1 Lf = 0.79 γ)	29 %
Toxoide Inst. +20 % PD	20 (1 Lf = 190 γ)	192 (1 Lf = 202 γ)	4	142 Lf (1 Lf = 6·6 γ)	142 Lf (1 Lr = 0.80 γ)	26 %
Toxoide Inst. 1648	29.5	295	0	280 Lf (1 Lf = 4.9 γ)	285 Lf (1 Lf = 1.14 γ)	3.4 %
Toxoide Inst. 1649	30	300	0	250 Lf (1 Lf = 3.75 γ)	217 Lf (1 Lf = 0.76 γ)	28 %
Toxoide Inst. 1653	47	470	0	416 Lf (1 Lf = 4.15 γ)	416 Lf (1 Lf = 0.75 γ)	11.5 %
Toxide Inst. 1652	47	470	0	416 Lf (1 Lf = 4 γ)	416 Lf (1 Lf = 0.64 γ)	11.5 %
Toxoide Inst. 1654	41.6	416	0	385 Lf	385 Lf (1 Lf = 0.75 γ)	7.5 %

Como se vé en la penúltima columna del cuadro, los valores de purificación son muy similares y oscilan entre 0.7 γ y 0.8 γ aproximadamente.

En resumen podemos decir que por esta técnica ideada por nosotros, las pérdidas son menores del 20 %. En cambio, por el método actualmente en uso difícilmente se consiguen pérdidas menores del 50 %. Esto tiene su interés, ya que han habido años en que se prepararon más de 8.000 litros de caldo. Además, la concentración al vacío del toxoide, permite trabajar con volumenes 10 veces menores.

El método simplificado podría realizarse en la siguiente forma: 400-500 litros de toxoide nativo, en vez de precipitarlo directamente, se lleva al alambique vitrificado, concentrado 10 veces (40-50) a menos de 30°C. de temperatura (pH 7.0). Recién entonces, se precipita en el punto isoeléctrico, se centrifuga o filtra por papel, y el precipitado se lava con mezcla buffer (pH 4.0). Por redisolución del precipitado, se llega a un toxoide de una pureza de 0.6 γ a 0.8 γ de nitrógeno por Lf.

ATENUACIÓN DEL TOXOIDE NATIVO

En el transcurso de este trabajo hemos observado muchas veces, en toxoides que tenían 30-40 días de preparados, una atenuación que llegaba hasta el 30 % de su valor inicial. ¿Cuál podría ser la causa de esta atenuación? Muchas toxinas que contenían como hidrato de carbono, glucosa, llegaban a un pH 8.3 - 8.4, en cambio si contenían maltosa el pH difícilmente llegaba a 7.8. Estas últimas toxinas no se atenuaban. La reacción demasiado alcalina o demasiado ácida favorece la atenuación. Rebajando la alcalinidad de la toxina a pH 7.6

se consigue detener la atenuación. La corrección del pH no influye en la precipitación del toxoide como se pudo ver. En esta forma toxoides mantenidos más de dos meses pierden menos del 10 % de su valor original. Esta pérdida se hace aún menor, si se conservan los toxoides en cámara fría.

ELIMINACIÓN DE LAS PORFIRINAS

El toxoide concentrado tiene generalmente un color rojo bastante intenso que fué muy difícil eliminar.

Se usa generalmente el gel de aluminio para separar parcialmente este colorante, pero por este método también se pierde una pequeña parte de los Lf presentes y no se purifican. Nosotros hemos conseguido separar cuantitativamente este colorante en la forma siguiente:

100 cm.3 de toxoide concentrado por cualquier de los métodos descritos en este trabajo, se precipitan en la forma habitual con H_2SO_4 5N. Se separa el precipitado por centrifugación y se lava con 100 cm.3 de alcohol a 96°. Se desmenuza bien el precipitado con una varilla de vidrio. Se separa por centrifugación el alcohol que ha tomado una coloración rojo intenso. Se repite el lavado con alcohol, acidulándolo ligeramente. Si no se acidula el alcohol, queda opalescente. Finalmente se elimina el alcohol con mezcla buffer a pH 4.0. Un toxoide ya preparado por rutina que contenía 530 Lf/cm.3 y 1.38 γ de N por Lf se precipitó. Llevando al volumen original nos dió un toxoide con 500 Lf/cm.3 y 0.70 γ de N por Lf. El mismo toxoide, pero lavado con alcohol en la forma antes descrita nos dió 500 Lf/cm.3 y 0.66 γ de N por Lf.

Estudiamos en cobayos, como se verá después, el poder vacunante de todos estos toxoides en presencia de gel de aluminio.

2da. PARTE, b) *Preparación de la vacuna.*

Como gel adsorbente para la vacuna antidiftérica, se usa en el Instituto el hidrato de aluminio Al (OH_3) (C. γ). Seguimos la misma técnica que emplea la sección vacuna y que consiste en diluir el gel, de manera que contenga 10 mgr. de Al (OH_3) por cm.3.

PREPARACIÓN DEL HIDRÓXIDO DE ALUMINIO "C"

Se hacen previamente las siguientes diluciones: 340 grs. de alumbre amoniacal, al que se le agregan 500 cm3 de agua destilada, aparte 160 gr. de sulfato de amonio con 3.250 cm3 de agua destilada. Y por último 250 cm3. de agua amoniacal al 22 %.

Método: Disolver cada sal por separado. La solución de alumbre amoniacal se lleva a ebullición, dejándola luego enfriar a 62° - 65° C. La solución de sulfato de amonio se lleva a un bañomaría, manteniendo la temperatura de 60° - 61° C. Dentro de la olla que

contiene el sulfato de amonio se coloca un agitador y se agrega al mismo tiempo, la solución de alumbre amoniacal y la solución de amoníaco al 22 %. Estas soluciones así mezcladas, se mantienen a la temperatura de 60° - 61° C. agitando 5 minutos violentamente y 15 minutos más lentamente. Luego se hacen por decantación varios lavajes con agua destilada y se lleva con agua a un volumen de 5.800 cm.3. 1 cm.3 de esta solución debe contener 10 mgr. de Al $(OH)_3$.

Seis litros de toxoide a pH 5.5 - 5.6 y con 30 Lf/cm.3 deben contener 300 cms.3 de este gel. Esta cantidad de gel es suficiente para adsorber los Lf presentes. Con el objeto de comprobar esta afirmación hicimos el siguiente ensayo: Se prepararon 2.500 cm.3 de vacuna (por supuesto con el gel correspondiente). A las 24 horas se filtró por papel doble. El filtrado se llevó a pH 7.0 con 5 cm.3 de una mezcla buffer a este pH y se concentró al vacío 25 veces. Se midieron hasta 10 Lf con resultado negativo. Con 20 % menos del gel tampoco se encontraron unidades floculantes después de concentrado 25 veces. Con 40 % menos de gel se encontraron 50 Lf en el concentrado, esto quiere decir que la vacuna primitiva contenía 2 Lf/cm.3 sin adsorber.

Se hicieron ensayos en blanco para comprobar la bondad de este procedimiento y no se pudiese objetar que el poder floculante residual se destruyese durante este proceso. Se concentró con este objeto 2,200 cm.3 de toxoide con 1 Lf/cm.3, 25 veces. Se encontró en el concentrado 17 Lf, en vez del valor teórico que serían 22 Lf.

Como el toxoide purificado tiene menos nitrógeno que el toxoide que se prepara en la rutina actualmente, hicimos ensayos de adsorción. Se pudo comprobar que también con la misma cantidad era adsorbido íntegramente. Con 20 % menos de gel no encontramos Lf sin adsorber.

PODER VACUNANTE EN COBAYOS

Hicimos un ensayo preliminar inyectando una dosis vacunante (30 Lf y gel) del toxoide común y del purificado. A los 28 días se inyectaron 10 d.m.m. de toxina a cada lote. El 30 % de cada lote murió antes del 4to. día, presentando edema. Prácticamente no notamos diferencia entre los dos lotes.

En cambio, sobreviven sin edema, si inyectamos 60 Lf con gel, de la vacuna purificada (contiene igual nitrógeno, que 30 Lf de la actual) después de inyectarle 10 d.m.m.

La experiencia se inició con 15 cobayos en cada tanda, pero por haberlos mantenido en jaulas, en malas condiciones, algunos murieron antes de inyectarle la toxina.

En la farmacopea de los Estados Unidos, el método consiste en inyectar a cobayos, una dosis vacunante y a las 6 semanas, se inyectan 5 d.m.m. que deben proteger al 80 % de los cobayos.

ENSAYO DE INOCUIDAD

Se inyectaron con 500 Lf cada cobayo, y se estudió el peso durante un mes. Se hicieron 2 lotes de 5 cobayos cada uno.

INOCUIDAD

Toxoide purificado (500 Lf)	N.º	Peso inicial	Peso a los 10 días	Peso a los 17 días	Peso a los 27 días
	361	272	290	251	245
	323	220	247	225	222
	387	280	290	271	280
	348	265	280	263	280
	373	242	277	265	265
Toxoide rutina (500 Lf)	393	224	230	222	215
	330	267	297	272	295
	307	250	247	265	256
	312	219	260	260	267
	347	235	210	216	210

No dan síntomas de intoxicación diftérica en ninguna de las dos tandas, y si bien no ha habido aumento de peso, se debe a las malas condiciones en que se mantuvieron en las jaulas.

NUEVOS ENSAYOS

Se inyectaron 4 cobayos con 5 Lf de la vacuna de rutina y a los 34 días se encontraron más de 1 u. a. y menos de 2 unidades. Se mezcló la sangre de los 4 cobayos antes de hacer la medición.

En las mismas condiciones anteriores se obtuvieron 3 u. a. para el lote inyectado con 10 Lf del toxoide purificado.

Ensayo comparativo del poder vacunante. — De 30 Lf + Al $(OH)^3$ de rutina y 60 Lf + Al $(OH)_3$ purificado.

El contenido del nitrógeno de la vacuna purificada correspondía a la mitad del que tenía el toxoide de rutina. De manera que 30 Lf del toxoide de rutina contenía el mismo nitrógeno que 60 Lf del purificado.

Se inyectaron 2 lotes con 25 cobayos cada lote y sobrevivieron todos pues fueron mantenidos en buenas condiciones (colocados en box); a los 48 días se les sacó sangre del corazón y se mezclaron las sangres de cada lote.

Empleamos cobayos de 250 grs. cada uno.

Con 30 Lf (rutina) y 60 Lf purificado, dió cada lote 3 u. a. (método de Ehrlich). Seguramente para el cobayo de 250 grs. la cantidad de Lf inyectada es muy grande y por eso no se notan diferencias en el poder vacunante. Esto no significa que las mismas dosis inyectadas en niños no den diferencias apreciables.

Para poder apreciar las diferencias inyectamos 15 cobayos con 5 Lf (rutina) y 15 cobayos con 10 Lf purificada (igual cantidad de nitrógeno). Sangramos a los 54 días y pudimos observar: los cobayos inyectados con 5 Lf (rutina) daban 1.25 u. a. y los inyectados con 10 Lf purificado 2 u. a. En vista de este resultado categórico, repetimos la experiencia con igual resultado. Esto nos indica que para el cobayo, 5 Lf de vacuna (con gel) de rutina, tiene menos poder vacunante que 10 Lf de la purificada por nosotros.

Para conocer las diferencias que pudieran existir inyectando menos vacuna, hicimos 4 lotes de 10 cobayos cada uno. Inyectamos un lote con 5 Lf, otro con 2.5 Lf. luego con 5 Lf purificada y 10 Lf también purificada. A los 40 días se sangraron los cobayos de cada lote, mezclando la sangre correspondiente.

TOXOIDE	Lf inyectados	u. a. encontradas
Rutina	2.5 Lf	0.8 u. a.
Rutina	5 Lf	1.4 u. a.
Purificada	5 Lf	1.5 u. a.
Purificada	10 Lf	1.8 u. a.

Prácticamente encontramos igual poder vacunante con 5 Lf sin purificar y con 5 Lf purificado. Es decir, en esta purificación ulterior no pierde su poder vacunante.

El purificado con 10 Lf, da un valor superior al que encontramos con 5 Lf purificado. Es decir que inyectando estas cantidades ya se nota diferencia para el cobayo, cosa que no habíamos encontrado para 60 y 30 Lf.

Con 2.5 Lf el poder vacunante es inferior al obtenido con 5 Lf. Demostraría este experimento la influencia de los Lf en el poder vacunante en las condiciones experimentales.

Interesaba por último comprobar si a la vacuna que le habíamos eliminado el colorante con el alcohol, había perdido su poder vacunante.

Inyectamos 3 lotes de cobayos (20 animales cada uno) con 5 Lf de vacuna; una tanda con la vacuna en uso (rutina, nueva serie), otra con la purificada por precipitación y lavado con alcohol, y otra tanda con la vacuna purificada por precipitación y lavado con alcohol, y otra tanda con la vacuna purificada por dos precipitaciones sucesivas.

Esta vacuna (rutina) nos dió 2 u. a. (a los 40 días), la obtenida por dos precipitaciones 1.60 u. a. y la purificada por precipitación y alcohol 2 u. a. No pierde valor por la acción del alcohol.

Creemos poder afirmar que este ensayo preliminar sobre el poder vacunante en cobayos, de estas vacunas muy purificadas, justifican un ensayo en gran escala en niños, con Schik positiva. Se podría comparar con la vacuna que se usa actualmente.

Para terminar podemos adelantar, que estamos estudiando la posible atenuación de la vacuna preparada, en todas sus formas, a la temperatura ambiente, en frío, en función del tiempo.

RESUMEN GENERAL

En la primera parte de este trabajo, estudiamos la concentración de los toxoides por precipitación, haciendo notar que los toxoides preparados con peptona del Instituto dan una pérdida del 60 % del valor inicial. Pero agregando al toxoide con peptona del Instituto, el 20 % de toxoide preparado con peptona Parke Davis, esta pérdida se reduce a la mitad.

En presencia de Cl Na al 10 %, la pérdida es aún menor. Se nota especialmente una diferencia marcada entre los toxoides nuevos y viejos en la recuperación con Cl Na.

En los toxoides recién preparados se pierde el 12 % del valor inicial, en cambio en los toxoides viejos estas pérdidas llegan al 28 %, en las mismas condiciones experimentales.

También describimos la técnica que usamos para concentrar el toxoide al vacío. En la mayor parte de los casos ensayados, la pérdida no fué mayor del 11.5 %. La pureza final obtenida es muy buena, llegándose a valores comprendidos entre 0,6 - 0,8 γ de N por Lf.

Se pudo observar también que el toxoide nativo se atenuaba a los 30 - 40 días de preparado, si el pH era de 8.3 a 8.4.

Reduciendo la alcalinidad a pH 7.6, se conseguía detener la atenuación. En esta forma los toxoides mantenidos más de dos meses a temperatura ambiente, pierden menos del 10 % del valor inicial.

También describimos someramente la técnica empleada para eliminar las porfirinas. Conseguimos preparar un toxoide concentrado (500 Lf/cm.3) incoloro, que solo contenía 0.66 γ de N por Lf. Por todos estos procesos no perdía el poder vacunante.

Estudiamos la preparación de la vacuna antidiftérica y la cantidad óptima de gel al (OH_3) necesaria para una absorción total. Todos estos ensayos se hicieron, con la vacuna que se usa actualmente y con la vacuna nueva purificada. Era necesario este estudio comparativo ya que el toxoide muy purificado tiene menos nitrógeno. Con 20 % menos de gel no se encontraron Lf sin adsorber.

Estudiamos por último, el poder vacunante de esta vacunas. Inyectando una dosis (rutina y purificada) y a los 28 días, 10 d. m. m. de toxina, sobrevivieron de los dos lotes, el 70 % de los animales. Con 60 Lf de la purificada, que contiene el mismo nitrógeno que 30 Lf de la actual, sobrevivieron el 100 % de los animales después de inyectarle 10 d. m. m. de toxina.

Ensayamos actualmente con mayor número de animales la experiencia anterior, agregando también la vacuna sin porfirinas.

Se estudió la inocuidad, inyectando 500 Lf por cobayo con buen resultado, como se puede ver en el trabajo.

Inyectando 30 Lf (rutina) de toxoide, sólo y 60 Lf de la purificada en dos lotes de 25 cobayos cada uno, se encontraron a los 48 días 3 u. a. en cada lote. Seguramente para cobayos de 250 grs. la cantidad inyectada es muy grande, o se han medido muy tardíamente las unidades antitóxicas, y así se explicaría las diferencias que existen al inyectar 10 d. m. m. Para poder apreciar las diferencias en otros dos lotes de 15 cobayos cada uno, inyectamos 5 Lf (rutina) y 10 Lf (purificada). Los cobayos con 5 Lf (54 días) daban 1.25 u. á. y los inyectados con 10 Lf. 2 u. á. Estas diferencias las pudimos comprobar en las repeticiones que hicimos, ya que eran de sumo interés. El poder vacunante de 5 Lf (rutina) y 5 Lf (purificado) es el mismo. Con 2,5 Lf el poder vacunante es inferior al obtenido con 5 Lf en cobayos. El poder vacunante de la vacuna sin porfirinas es el mismo, que el sin purificar..

Al finalizar este trabajo agradecemos al Sr. Abelardo Peña Ramos la colaboración prestada.

BIBLIOGRAFÍA

1. SORDELLI A. FERRARI J., GVIRTZMAN I., MODERN F., RUFF G Y REPETTO O. — Rev. Inst. Bact., **12**, 1, 83, 1943.
2. SORDELLI A., SAVINO E. Y FERRARI J. — Rev. Inst. Bact., **6**, 5, 687, 1935.
3. POPE C. G. Y LINGCOOD — The Brit. J. of. Exp. Path., **20**, 4, 297, 1939.
4. PAPPENHEIMER A. — The J. of. Biol. Chem., **120**, 2, 543, 1937.
5. PAPPENHEIMER A. Y ROBINSON E. S. — J. Immunol, **32**, 291, 1937.
6. EATON M. — The J. of Bact., **31**, 347, 1936.
7. PIROSKY I. PIROSKY R. R. DE. — Rev. Inst. Bact., **11** ,1, 118, 1942.
8. PILLMER L., GROSSBERG D. Y WITTER G. — J. of. Immunol, **54**, 3, 213, 1946.
9. MODERN F., RUFF G. Y GATTI A. — Rev. Soc. Arg. de Biol., **22**, 3, 451, 1946.