Estabilidad de vacunas antidiftéricas

Estudio comparativo de la vacuna común y de las purificadas

por Fernando Modern, Guillermo Ruff y Alejandro Gatti

Interesados en conocer el comportamiento de las vacunas que describimos en el trabajo anterior, realizamos este estudio, que lo presentamos con el carácter de comunicación preliminar.

En el año 1936, Eaton (1) consigue purificar toxina diftérica, empleando distintos métodos y llega a valores de 0.0005 mgm. de nitrógeno por Lf. La estabilidad de estas toxinas muy purificadas es buena, siempre que se mantengan en cámara fría.

Pappenheimer y Johnson (2), dándose cuenta de la importancia del hierro en la producción de toxina, estudian la cantidad óptima de ese metal en el medio de cultivo.

Mueller (3), comprueba las observaciones anteriores, haciendo notar la importancia de ese metal en la producción de toxina por el "Corynebacterium diphteriae".

En un trabajo recientemente publicado (*), Pappenheimer (4) reinvestiga el efecto del hierro, en la producción de toxina y porfirina. Cantidades muy pequeñas de hierro, impiden el desarrollo de los gérmenes y la producción de toxina diftérica. Cuando el medio contiene 0,1 mgm. de hierro por litro, se obtiene el máximo de producción de toxina. Si las cantidades de hierro aumentan, el medio se empobrece en toxina, llegándose a inhibir totalmente la producción cuando la concentración alcanza a 0,6 mgm. de hierro por litro.

Este autor encuentra, que cuatro átomos de hierro agregados al medio de cultivo, sobre el valor óptimo necesario para la producción de toxina, hacen desaparecer, cuatro moléculas de porfirina y una de toxina. Por lo tanto, Pappenheimer hace notar que existe un paralelismo entre la toxina y la porfirina, y cuando el hierro inhibe

(*) Agradecemos al Dr. Mittelman el habernos facilitado un ejemplar de ese trabajo.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 19 de agosto de 1947.

la producción de toxina, también inhibe la producción de porfirina. Considera a la toxina diftérica, como una proteína específica, que conjuntamente con la porfirina y el hierro forman un complejo que supone, se trata de una enzima respiratoria.

Nosotros (5) independientemente, en un trabajo recientemente publicado, estudiamos la purificación de diferentes toxoides diftéricos y describimos las técnicas usadas en cada caso. Conseguimos obtener toxoides de fácil purificación, uno de ellos sin porfirina, que la separamos, por alcohol etílico. En esta forma, preparada la vacuna por el agregado de gel Al (OH_3), conseguimos vacunar cobayos sólo con la proteína específica. Encontramos que inyectando 5 Lf de la vacuna en uso actualmente, a los 34 días, los cobayos dan más de 1 u.a. y menos de 2 u.a. en la sangre. En las mismas condiciones, se obtenían 3 u.a. si vacunábamos los cobayos con 10 Lf (igual nitrógeno que 5 Lf del anterior) de la vacuna purificada, pero con porfirina. Con 30 Lf + gel (rutina) y 60 Lf + gel de la purificada, cada lote dió 3 u.a. Para cobayos de 200 gr., la cantidad de Lf inyectada es muy grande y por eso creemos no notar diferencias en el poder vacunante en ese ensayo.

En cambio, inyectando cantidades menores encontramos diferencias, y así obtuvimos con 2,5 Lf (rutina) 0,8 u.a. y con 5 Lf de la misma 1,4 u.a.

Cinco Lf de la vacuna purificada dieron 1,5 u.a. en la sangre y 10 Lf, 1,8 u.a. Entonces, también estudiamos comparativamente el poder vacunante de 5 Lf de la vacuna en uso, con la *purificada sin porfirina* y encontramos en los dos lotes de animales, 2 u.a. Por lo tanto, se pudo comprobar, que por la acción del alcohol, la vacuna no pierde el poder vacunante.

Estos ensayos nos indicaban que se podía separar la proteína específica, de la porfirina y mantener el poder vacunante. Este poder lo conserva íntegramente hasta los 9 meses de mantenida a temperatura ambiente. En cambio, la vacuna preparada con toxoide purificado, en cualquiera de sus formas pero con porfirina, se atenúa con el tiempo a temperatura ambiente. Sólo conserva su valor íntegramente si se mantiene a baja temperatura en la heladera.

Otro hecho interesante, de nuestro método de separación de la porfirina, es el empleo de alcohol etílico a 96° y a temperatura ambiente, que separa la porfirina y no desnaturaliza la proteína específica, que conserva su valor vacunante y floculante frente al suero antidiftérico.

Todo pasa como si la porfirina a temperatura ambiente, destruyese con el tiempo, parcialmente el poder vacunante, que está radicado en la proteína específica.

Naturalmente, que a esto se podría objetar, que la substancia atenuante pudiera ser otro elemento soluble en el alcohol a 96°. Conviene por lo tanto, si consideramos como Pappanheimer al toxoide diftérico como una substancia proveniente de una enzima respirato-

ria, disociarla, separando la porfirina de la proteína específica y usar esta última sólo para la vacunación antidiftérica.

En estos ensayos que publicamos, que son continuación del trabajo anterior (loc. cit.) describimos someramente, para no repetir, la preparación de las vacunas utilizadas.

PREPARACIÓN DE LAS VACUNAS ENSAYADAS

1) La vacuna actualmente en uso corresponde a un toxoide que contiene 1,4 γ a 1,5 γ de nitrógeno por Lf. Fué preparada en líneas generales precipitando la parte activa en su punto isoeléctrico (pH ± 3,5), filtrada por papel y redisuelto el recipitado en un volumen 10 veces menor y llevada a pH 7. Al prepararse la vacuna, se llevó el toxoide a pH 5,5 y se le agregó el gel correspondiente, en la proporción que figura en el trabajo que hemos publicado. Debe contener 30 Lf por ml.

2) La vacuna purificada, corresponde a la anterior, pero que se vuelve a precipitar por segunda vez, en su punto isoeléctrico, y se lava con mezcla buffer (pH4) antes de redisolverla. En esta forma, sólo contiene de 0,65 a 0,75 γ de nitrógeno por Lf. Por lo tanto, 60 Lf tienen el mismo contenido nitrogenado que 30 Lf de la anterior.

3) A la vacuna purificada se le elimina la porfirina, por lavado con alcohol a 96°, del último precipitado a temperatura ambiente. Se elimina el alcohol que impregna el precipitado, por lavado con mezcla buffer a pH 4.

Todos los detalles referentes a estas operaciones, figuran en el trabajo anteriormente publicado.

Envasadas las vacunas, una parte se conservó a temperatura ambiente, y otra en la heladera a 4°C. Recién a los 9 meses se ensaya el poder vacunante de cada una.

Como en el primer ensayo sobrevivieron todos los cobayos vacunados, a la inyección de 10 L+ de toxina, se sangraron a los 8 días de esta inyección y se midió el valor antitóxico.

A continuación, damos los pormenores de este ensayo.

ENSAYO DEL PODER VACUNANTE CON DOS ESTÍMULOS SUCESIVOS

Inyectamos 7 lotes de 10 cobayos cada uno, en la siguiente forma:

Lote 1. — Con 30 Lf + gel de la vacuna, que se usa en la rutina actualmente. (1 dosis vacunante).

Lote 2. — Igual valor anterior, pero de la vacuna purificada, que contiene la mitad de nitrógeno.

Lote 3. — Dos dosis vacunantes (60 Lf + gel), de la vacuna purificada.

Lote 4. — Dos dosis de la vacuna purificada, sin porfirina.
Lote 5. — Igual al lote 1.
Lote 6. — 30 Lf + gel, de la vacuna que se usa actualmente, pero en cobayos de 700 gr. cada uno (en vez de 250-300 gr. como corresponden a los lotes anteriores).
Lote 7. — 2 dosis vacunantes (60 Lf + gel purificado). Cobayos de 700 gr. cada uno.

A las 5 semanas, se inyectó a cada cobayo 10 L+ de toxina, y todos sobrevivieron a la inyección. A los 8 días, se sangraron los cobayos y se mezcló la sangre de cada lote.

Medidas las unidades antitóxicas de estas mezclas, se comprobó que el valor había aumentado enormemente en todos. El lote 4 y 7, daba el doble del valor antitóxico con respecto a los otros lotes. Es decir, que con el segundo estímulo, las mejores vacunas resultaban ser las de 60 Lf con gel, sin porfirina y la purificada (60 + gel), correspondiente a los cobayos grandes. Las vacunas utilizadas en este ensayo, fueron preparadas y mantenidas en la heladera hasta ser utilizadas.

Como no notábamos diferencias, usando cobayos chicos (± 200 gr.) aquí utilizamos cobayos de 250-300 gr. cada uno y también de 700 como se puede ver en este ensayo.

Se nota en seguida en este experimento, la influencia de las dos dosis vacunantes iniciales. Sólo en el lote 3 no notamos un aumento tan grande. A continuación describimos el ensayo realizado con las diferentes vacunas en función del tiempo y temperatura.

Vacunamos 7 lotes de cobayos, cada lote compuesto de 10 animales. A las 4 semanas, fueron sangrados y mezclada la sangre correspondiente a cada lote. Separados los glóbulos por centrifugación, se midió en el plasma sobrenadante, el valor antitóxico de los sueros. Las vacunas habían sido preparadas en el mes de octubre del año pasado. Se midió el valor en el mes de julio de este año, es decir 9 meses de estacionamiento. Una parte se conservó en la heladera a 4°C. y la otra a temperatura ambiente. Se emplearon cobayos de 250-300 gr. de peso y la vacuna se inyectó por vía subcutánea.

Los lotes 1 y 2, fueron vacunados con la vacuna que se usa actualmente en la rutina y que preparamos con un contenido nitrogenado de 1,4 γ a 1,5 γ por Lf.

Los lotes 3 y 4 con vacuna preparada con toxoide purificado por dos precipitaciones en el punto isoeléctrico y que sólo contenía de 0,7 a 0,8 γ de nitrógeno por Lf.

El lote 7 también fué vacunado con el mismo toxoide anterior, pero usando doble volumen (60 Lf+ gel).

Los lotes 5 y 6 con vacuna preparada con un toxoide libre de porfirina. Para el lote 6 se usó doble volumen de la vacuna, mantenida durante 9 meses a temperatura ambiente.

Ensayo N.º	Vacuna inyectada	Temperatura	Unidades antitóxica
1	30 Lf gel, vacuna en uso	ambiente	2.5 u. a.
2	30 Lf gel, vacuna en uso	heladera	5.0 u. a.
3	30 Lf gel (purificada)	ambiente	2.5 u. a.
4	30 Lf gel (purificada)	heladera	5.0 u. a.
5	30 Lf gel (sin porfirina)	ambiente	4.0 u. a.
6	60 Lf gel (sin porfirina)	ambiente	9.0 u. a.
7	60 Lf gel (purificada)	ambiente	2.5 u. a.

Del cuadro anterior sacamos las siguientes conclusiones:

a) La vacuna preparada con toxoide diftérico, sin porfirina (5) prácticamente no se atenúa a temperatura ambiente.

b) La misma, pero inyectando 2 dosis de vacuna (6) (60 Lf + gel) llega a dar 9 unidades antitóxicas en el plasma de los cobayos. Prácticamente, el doble del valor que dan las vacunas usadas actualmente y conservadas en la heladera.

c) La vacuna que se usa actualmente (1), pierde en 9 meses de conservada a temperatura ambiente, el 50 % del valor primitivo. Pasa de 5 u.a. a 2,5 u.a.

d) La vacuna purificada sin la eliminación de la porfirina, también a los 9 meses de permanecer a temperatura ambiente, pierde el 50 % de su valor primitivo.

Repetimos actualmente estos ensayos con las mismas vacunas, y creemos poder adelantar, con todos estos experimentos, y los ya publicados, que conviene usar una dosis vacunante con mayor número de Lf, que las que actualmente están en uso. Por otra parte, la vacuna purificada y la que no contiene porfirina, tiene la mitad de nitrógeno por Lf.

Es decir, que podemos duplicar el contenido en Lf, sin aumentar el nitrógeno presente. Naturalmente, como también pudimos comprobar, dos estímulos sucesivos elevan el tenor antitóxico en la sangre de los cobayos. Los valores obtenidos son mucho mejores, si la primera inyección se hace con 60 Lf.

Otro resultado interesante, es el obtenido con la vacuna sin porfirina, que no se atenúa conservada 9 meses a temperatura ambiente. El valor obtenido, es de 9 u.a., si utilizamos una vacuna que contenga 60 unidades floculantes. El ensayo se hizo en cobayos de 250 a 300 gr. de peso.

La vacuna usada en la rutina actualmente, en el mismo tiempo, pero inyectando 30 unidades floculantes sólo da 2,5 unidades antitóxicas. Es decir, *que tiene un poder 3,6 veces mayor la vacuna sin porfirina,* en igual tiempo, siempre que se duplique la dosis vacunante.

A pesar de todo, el valor de la vacuna en uso estaría de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos. Esta dice, que la dosis debe ser tal, que inyectada en cobayos de 500 grs. produzca 2 u.a. en la sangre a las 4 semanas.

CONCLUSIONES

1°) La vacuna en uso, se atenúa mantenida 9 meses a temperatura ambiente.
En la heladera conserva su valor.

2°) La vacuna purificada contiene de 0,6 a 0,8 γ de nitrógeno por Lf. Tiene igual poder vacunante que la que se usa actualmente. Si inyectamos el doble de dosis floculantes, obtenemos una mejor respuesta en el valor antitóxico en la sangre de los cobayos.

3°) En la vacuna purificada, 60 Lf contienen igual nitrógeno que 30 Lf de la vacuna en uso.
Dos estímulos sucesivos, producen un gran aumento en el valor antitóxico de la sangre, principalmente la diferencia es grande, si se ha usado 60 Lf de la purificada como primera dosis.

4°) La vacuna purificada sin porfirina, no se atenúa a temperatura ambiente en 9 meses.
60 Lf con gel de esta vacuna (9 meses temperatura ambiente) dan 9 unidades antitóxicas a las 4 semanas.

Este valor es 3,6 veces mayor, que el producido por la vacuna en uso en igual tiempo, siempre que se inyecten 30 Lf (igual contenido de nitrógeno que 60 Lf de la vacuna purificada sin porfirina).

SUMMARY

Diphteria toxoids prepared in three different ways described in a previous paper. Samples were stored at room temperature and in the ice box for 9 months and the antigenic power was then tested. A porphyrin free purified toxoid was formed to be stable at room temperature after 9 months; 60 Lf gave 9 antitoxic unit in guinea pigs, 4 weeks after injection; about 3,6 time the amount obtained by injecting 30 Lf of the routine toxoid. Purified toxoid containing porphyrin (0,70g/Lf) and routine toxoid (1,4 — 1,5 g/Lf) lost 50 % their antigenic power when stored at room temperature for 9 months; but the antigenic power was slightly greater (5 A.U.) than that of porphyrin free toxoid (4 O.U.) when stored in the ice box. A double dose of porphyrin free toxoid (60 Lf) was more efficient in producing a high antitoxic value in circulating blood of guinea pigs then routine toxoid. The N content in this doble dose was the same as that in a single dose of routine.

BIBLIOGRAFÍA

1. EATON M. D. — J. of. Bact. **31**, 367, 1936.
2. PAPPENHEIMER A. Y JOHNSON S. — Brit Journ. of Exp. Path., **17**, 335, 1936.
3. MUELLER H. — J. of. Imm. **42** 343,1941.
4. PAPPENHEIMER A. — The Journ. of Biol Chem., **167**, 251, 1947.
5. MODERN F., RUFF G. Y GATTI A. — An. As. Quím. Arg., **35**, 82, 1947.