

SOBRE UNA NUEVA TECNICA UTILIZADA PARA
LA CONCENTRACION Y PURIFICACION DE
TOXOIDE DIFTERICO

**FERNANDO MODERN, GUILLERMO RUFF y
ALEJANDRO GATTI**

La preparación de toxinas, toxoides y antitoxinas diftéricas y tetánicas purísimas ha sido una preocupación permanente para el Instituto. En los últimos años, muchos trabajos se han publicado aquí y en el extranjero. Pillemer, Grossberg y Wittler (1) emplean el alcohol metílico para purificar el toxoide tetánico y lo hacen en condiciones perfectamente determinadas. Más adelante, Wittler y Pillemer (2) estudian la solubilidad de la antitoxina tetánica en mezclas de alcohol metílico y agua, a distintos pH, concentración iónica y temperatura. Ross (3) estudia un método para purificar el toxoide diftérico precipitando las proteínas inertes con protamina. Holt (4) usa el medio sintético de Müller y reconoce que la cantidad de toxina depende en alto grado de la cantidad de Fe y cloruro de sodio y de la concentración de aminoácidos. Ultimamente Pillemer, Wittler, Burrell y Grossberg (5), describen un método para purificar y cristalizar la toxina tetánica y estudian las constantes físicas más importantes. Nosotros en un trabajo ya publicado (6) demostramos que si se concentra el toxoide diftérico nativo 10 veces al vacío, se consigue precipitar más del 90% del principio activo a pH alrededor de 3.8. Esto significaba una ventaja sobre la precipitación directa del toxoide nativo en su zona isoelectrónica, pues pocas veces daba un rendimiento mayor del 50%, como lo demostraron Sordelli, Savino y Ferrari (7). Sin embargo, este método de concentración al vacío era más trabajoso que el anterior, sobre todo si se piensa que hubiera sido necesario concentrar más de 8.000 litros de toxoide por año.

Tratando de encontrar otro método práctico, evitando las pérdidas elevadas, a pedido del Dr. Savino, ensayamos

Presentado para publicar el 18 de julio de 1950.

con éxito el método que empleamos en la purificación y concentración del toxoide tetánico (8).

Pudimos comprobar en trabajos anteriores (9) que toxoides diftéricos de 400 Lf o más por ml. se precipitan en su zona isoeléctrica sin observar pérdidas. En cambio, toxoides nativos de 40 Lf por ml. si bien precipitan, lo hacen sólo parcialmente, perdiéndose el 50 % del valor primitivo. En este trabajo estudiamos sistemáticamente la influencia de las peptonas, el pH y la acción de la temperatura y del alcohol etílico. En toxoides preparados con peptona hecha en el Instituto, cuya técnica figura en el trabajo antes citado, conseguimos precipitar cuantitativamente el principio activo por alcohol al 40 %, baja temperatura, a un pH comprendido entre 4.0 y 4.75. Trabajamos a una temperatura de -12°C — 14°C . La filtración de los distintos precipitados se realizó sin inconvenientes en cámara fría. Por alcohol etílico conseguimos una relación de purificación de 20 veces y llevamos el precipitado a un volumen final 10 veces menor, obteniendo alrededor de 400 Lf/ml. En esta forma, estábamos en condiciones de precipitar el toxoide concentrado en su zona isoeléctrica sin pérdidas. En esta segunda precipitación la relación de purificación era grande y los toxoides obtenidos daban alrededor de 1 γ de N por Lf.

Con peptona Parke Davis hemos observado dificultades en la filtración de los precipitados en alcohol. El precipitado a pH 4.75 no fué posible separarlo por filtración. En los que fué posible filtrar, la relación de purificación no era mayor de 15 veces, pero también sin pérdidas en las Lf iniciales.

En el cuadro que va a continuación damos los resultados obtenidos en la precipitación alcohólica a diferentes pH.

El primer toxoide que fué preparado originariamente con peptona P.D. y que daba 110 γ de N por Lf, pasa después de concentrado con alcohol, a 9,5 - 11,3 γ de N. En cambio, el toxoide preparado con peptona "Instituto" y que contenía originariamente 85,8, de N por Lf pasa a más o menos 5 γ por Lf. Una segunda precipitación alcohólica de una mezcla del toxoide P.D. (pH 4.15-3.90 y 3,68) da una relación de purificación de 2,5 γ de N por Lf

PRECIPITACIÓN POR ALCOHOL A DIFERENTES pH

TOXOIDE	mg.N/ml	mg.N/ml	γ de N/Lf	Pérdidas %
Original (pept. P. D.)	3.36	33.3	110	—
pH 4.15	0.315	33.3	9.5	0
3.90	0.315	33.3	9.5	0
3.68	0.315	27.7	11.3	15
Original N° 1987 (pept. Inst.)	3.60	42	85.8	0
pH 4.75	1.22	333.3(*)	3.67	0
4.50	1.61	333.3	4.83	0
4.25	1.71	333.3	5.14	0
2ª precipitación por alcohol del primer toxoide (P.D.)	0.063	25.5	2.5	9

(*) Volumen 10 veces concentrado.

con una pérdida del 9 % del valor original.

La relación de purificación de estas precipitaciones por alcohol no tiene un valor práctico de importancia ya que la precipitación ácida seguida en la zona isoeléctrica permite, en todos los casos, obtener toxoides que dan alrededor de 1 γ de N por Lf. Importa, en cambio, mucho la reducción del volumen ya que toxoides de 300-400 Lf/ml. precipitan por ácido sin pérdidas en sus Lf.

Los toxoides concentrados y purificados por alcohol etílico son sometidos a una precipitación a pH 3.5-3.6. Pudimos comprobar, como se puede ver en el cuadro que va a continuación, que las pérdidas en estos casos nunca fué superior al 16 %.

La precipitación ácida que sigue a la alcohólica da un promedio de 1 γ de N por Lf, que es un valor muy aceptable para los toxoides purificados, aptos para la vacunación antidiftérica. También usando peptona P.D. logramos buena purificación, pero la filtración alcohólica fué más lenta. En ensayos recientes hemos podido prácticamente reducir la pérdida total a menos del 10 %, si agregamos el alcohol en dos etapas para evitar la elevación de temperatura.

A continuación describimos la técnica que usamos

PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE LOS TOXOIDES CONCENTRADOS
POR ALCOHOL

TOXOIDE	Lf/ml.	Lf/ml.	γ de N/Lf	Pérdidas %
Toxoide P. D. Precip. ácida (5 veces concentrado)	0.105	27.5	1.82	0
Precipitación ácida de alcohólica (4.75)	0.26	280	1.91	0.6
Precipitación ácida de alcohólica pH 4.50)	0.30	313	1.96	0
Precipitación ácida de alcohólica pH 4.25)	0.31	295	1.04	1.4

actualmente y en la que se pueden ver los detalles necesarios para lograr sistemáticamente un buen toxoide sin pérdidas en sus Lf iniciales.

Se calculó previamente en una parte alícuota la cantidad necesaria de ácido para llevar los 11,2 l. de toxoide diftérico a pH 4.5. Se eligió este pH entre los ensayados por ser la filtración más rápida, sin observarse pérdidas. Al toxoide que estaba a 8°C, se le agregaron 4 litros de alcohol etílico a -14°C. Se mezcló bien y se dejó 24 h. en cámara fría a -14°C. La temperatura de la mezcla llega a -8°C. Después de este tiempo se adicionó el ácido sulfúrico calculado para pH 4.5 y se agregaron los otros 4 litros de alcohol a -12°-14°C (concentración final 40 %). La temperatura se mantuvo a -8°C. Después de otras 24 h. se filtró por papel plegado en cámara fría. El precipitado se redisolvió en 1.120 ml. con hidrato de sodio hasta pH 7.2-7.4. En esta precipitación alcohólica no se pierde valor y se obtiene un toxoide de 400 a 500 Lf por ml. Los 1.120 ml. de la redisolución anterior para conseguir una ulterior purificación y eliminación total del alcohol se lleva a pH 3.6 (zona isoelectrica) con ácido sulfúrico. Antes de la hora se centrifuga y se redisuelve el precipitado de nuevo en 1.120 ml. agregando hidrato de sodio hasta pH 7.2-7.4. Una segunda precipitación ácida no mejora prácticamente la relación de purificación.

A continuación, en un cuadro, damos los valores obtenidos en una serie de concentraciones que se hicieron siguiendo el método anteriormente descrito.

PURIFICACIÓN DE LOS TOXOIDES

TOXOIDE	mg.N/ml	Lf/ml.	γ de N/Lf	Pérdidas %
Nº 2054 (Instituto)	3.64	45.5	80	—
Precipitación alcohólica	0.784	455	1.72	0
Redisolución de precip. ácida	0.228	455	0.50	0
Nº 2055 (P. Davis)	0.409	45	90.08	—
Precipitación alcohólica	1.169	350	3.34	22
Redisolución de precip. ácida	0.612	350	1.75	22
Nº 2058 (Instituto)	4.13	48.5	85.1	—
Precipitación alcohólica	1.183	485	2.44	0
Redisolución de precip. ácida	0.42	450	0.933	7.2
Nº 2062 (Instituto)	3.92	36	108.8	—
Precipitación alcohólica	1.61	360	4.47	0
Redisolución de precip. ácida	0.308	320	0.96	11.1
Nº 2052 (Parke Davis)	3.92	41.5	94.4	0
Precipitación alcohólica	0.784	415	1.88	0
Redisolución de precip. ácida	0.322	357	0.90	14
Nº 2049 (Instituto)	3.6	50	72.4	—
Precipitación alcohólica	0.910	500	1.8	—
Redisolución de precip. ácida	0.26	435	0.59	13

En el cuadro anterior figuran dos toxoides preparados originariamente con peptona P.D., el Nº 2055 y 2052. El primera da finalmente 1,75 γ de N por Lf y una pérdida total de 22 %. El otro toxoide (Nº 2052) da una relación de purificación mejor (0,90 γ de N por Lf) y una pérdida del 14 %.

Los otros toxoides preparados con peptona Instituto dan en general una relación de purificación mejor, llegándose a obtener en el toxoide Nº 2054, 0,50 γ de N por Lf y en el Nº 2049, 0,59 γ de N por Lf. En este último to-

xoide se perdió el 13 % del valor primitivo.

Los otros toxoides estudiados dan valores muy buenos, ya que alrededor de 0,90 γ de N por Lf.

Las pérdidas en general, trabajando con nuestra peptona, no pasan del 10 %, lo que ya es una gran ventaja sobre los otros métodos que dan pérdidas muy superiores y sin llegar tampoco a la buena relación de purificación que encontramos.

Se inmunizaron 25 caballos con los toxoides obtenidos por el método anteriormente descrito. El resultado obtenido reveló su aptitud inmunizante, similar por lo menos en esta serie con los obtenidos por los procedimientos de rutina.

RESUMEN

Se estudia sistemáticamente la influencia de las peptonas, el pH y la temperatura en la precipitación por alcohol etílico al 40 % del toxoide diftérico.

Conseguimos precipitar cuantitativamente el principio activo por alcohol al 40 % (-12°C) a un pH regulado y comprendido entre 4.0 y 4.75.

Por alcohol etílico en las condiciones anteriores conseguimos una relación de purificación de 20 veces y llevamos el precipitado a un volumen final 10 veces menor, obteniendo alrededor de 400 Lf/ml. Así estábamos en condiciones de precipitar el toxoide diftérico concentrado y semi-purificado con ácido en su zona isoeléctrica.

En esta segunda precipitación, la relación de purificación era buena y los toxoides obtenidos daban alrededor de 1 γ de N por Lf. En un caso llegamos a 0.50 γ de N por Lf. Las pérdidas en general no pasan del 10% del contenido inicial.

Este toxoide así purificado y concentrado reveló su aptitud inmunizante.

SUMMARY

The influence of peptones, the pH and the temperature in precipitation by ethylic alcohol at 40 % of diphtheric toxoid, is systematically studied.

We succeeded in the quantitative precipitation of the active principle by alcohol at 40 % (-12°C .) with a

By ethylic alcohol in former conditions we obtained a purification-relation of 20 times and carried the precipitate to a final volume 10 times minor, obtaining about 400 Lf/ml. We were in conditions to precipitate the concentrated and semi-purified diphtheria-toxoid with acid in its iso-electric zone.

In this second precipitation, the purification-relation was a good one, and the toxoides obtained gave about 1, N per Lf.

In one occasion, we arrived to a 0,50 γ N per Lf. The loss did not surpass generally the 10% of the initial contents.

This toxoid thus purified and concentrated, revealed its immunity fitness.

BIBLIOGRAFIA

- 1) L. PILLEMER, D. B. GROSSBERG Y R. WITTELR. — *The J. of Immunol.* Vol. 54, N^o 3, pág. 213, año 1946.
- 2) R. WITTLER, G. RUTH Y LUIS PILLEMER. — *The J. of Immunol.* Vol. 62, pág. 463, año 1949.
- 3) V. ROSS. — *The J. of Immunol.* Vol. 63, N^o 2, pág. 183, año 1949 y 59, N^o 2, pág. 207, año 1948.
- 4) J. HOLT. — *Brit. Jour. Exptl. Path.* Vol. 29, N^o 4, pág. 333, año 1948.
- 5) L. PILLEMER, R. WITTLER, J. BURRELL Y D. B. GROSSBERG. — *Jour. Exptl. Med.* Vol. 88, N^o 2, pág. 205, año 1948.
- 6) F. MODERN, G. RUFF Y A. GATTI. — *Rev. Inst. Bact. Malbrán.* Vol. 13, N^o 1, pág. 210, año 1948.
- 7) A. SORDELLI, E. SAVINO Y J. FERRARI — *Rev. Inst. Bact.* Vol. 6, N^o 5, pág. 687, año 1935.
- 8) F. MODERN, G. RUFF Y A. GATTI. — *Rev. Inst. Bact. Malbrán.* Vol. 14, N^o 1, pág. 180, año 1949.
- 9) F. MODERN, G. RUFF Y A. GATTI. — *Rev. Inst. Bact. Malbrán.* Vol. 13, N^o 13, pág. 320, año 1948.