

PURIFICACION DE TOXOIDES DIFTERICO Y TETANICO

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

En una serie de trabajos (1) estudiamos la purificación y concentración de los toxoides tetánico y diftérico, y conseguimos una vacuna para uso humano de excelente valor. La purificación de estos toxoides se llevó a cabo empleando el alcohol etílico en vez del metílico (Pillemer) en condiciones perfectamente determinadas y seguidas de otras precipitaciones que detallamos en este trabajo.

Se estudió la valoración de esos toxoides en general como lo hacen Goldie, Parsons y Bowers (2) aplicando el método de floculación de Ramón; usando una antitoxina (tetánica) modificada por digestión péptica de acuerdo a los trabajos de Parfentjev y Pope. Empleando toxoide tetánico purificado conseguimos una zona específica de floculación que corresponde al valor real. Con toxoide tetánico sin purificar y de bajo valor no obtuvimos floculación. Los toxoides diftéricos floculaban a cualquier concentración y pureza. El toxoide diftérico purificado por estas técnicas contenía de 1100 a 1800 Lf por mg. de nitrógeno.

Ross (3) consigue 2000 Lf por mg. de nitrógeno, usando protamina para separar las proteínas microbianas y precipitando con ácido tricloroacético.

Sin embargo el rendimiento es inferior y la técnica más complicada.

Empleando sulfato de amonio como precipitante, Levine, Wyman y Edsall (4) consiguen un toxoide diftérico de igual valor al obtenido por Ross.

En nuestros ensayos y en la rutina los rendimientos obtenidos al purificar los toxoides son superiores al 80% del valor inicial. A continuación describimos la técnica empleada en la purificación y concentración de los toxoides tetánico y diftérico. Seguidamente describimos el fraccionamiento por sulfato de sodio de los toxoides, la elec-

Presentado para publicar el 17 de abril de 1951.

trodialisis de los mismos y por último su valor antigénico.

PARTE EXPERIMENTAL

PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL TOXOIDE TETÁNICO. *Primera concentración alcohólica.* — A 30 litros del toxoide tetánico nativo, se le agregan 10.5 litros de alcohol etílico a -12° C. Esta mezcla se mantiene en cámara fría a -12° C. durante 48 horas. Luego se agrega la cantidad necesaria de H_2SO_4 5 n para llevarlo a pH 4,9 y 11 litros de alcohol enfriado previamente a -12° C. La mezcla alcanza una temperatura de $-10^{\circ}C.$, $-8^{\circ}C.$ A las 24 horas de permanecer en cámara fría a -12° C., se filtra en el mismo lugar por papel. El precipitado se disuelve en agua a pH 7,2 (con NaOH al 10 %), llevando el volumen a 3 litros.

Segunda concentración alcohólica. — A los 3 litros de toxoide provenientes de la primera concentración alcohólica, se le agrega 1 litro de alcohol enfriado a -12° C. Después de permanecer 48 horas en cámara fría a -12° C., se le agrega la cantidad necesaria de H_2SO_4 n para llevarlo a pH 4.9. A continuación se añade el resto del alcohol (1150 ml.) que también fueran enfriados a -12° C. A las 24 horas se filtra por papel en la misma cámara y el precipitado se redisuelve en agua a pH 7.2 (NaOH al 10 %) llevando el volumen finalmente a 1,2 litros y que corresponde a una concentración en volumen de 25 veces.

PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL TOXOIDE DIFTERICO. — De acuerdo a lo que ya hemos publicado (loc. cit.) se hace una concentración alcohólica en la misma forma que describimos para el tetánico, pero a pH 4.5, concentrando el volumen 10 veces. Se consigue un toxoide que contiene por lo menos 400 Lf/ml. y sin pérdidas en sus Lf iniciales. Así concentrado puede precipitarse por ácido en la zona isoelectrica (pH. 3.6). Las pérdidas totales difícilmente sobrepasan el 15 - 20 % de las dosis floculantes iniciales. En general. de 80 a 90 γ de N por Lf que tiene el toxoide diftérico nativo, pasa a 1.5 - 1.8 γ de N por Lf, después de la precipitación alcohólica; para llegar a tener después de la concentración isoelectrica, 0.5 a 0.9 γ de N por Lf.

Los toxoides tetánicos nativos contenían alrededor de 1.8 a 2.0 Lf por mg. de N. Los purificados por dos concentraciones por alcohol según técnica descripta contie-

nen alrededor de 120 Lf. m. g. de N. Estos toxoides son estables y pueden filtrarse por bujía sin perder su valor inicial.

Se consigue una mejor purificación del toxoide tetánico ya precipitado por alcohol, con una precipitación con SO_4Na_2 al 15 % llegándose a un valor que oscila entre 350 y 400 Lf por mg. de N (ver adelante).

FRACCIONAMIENTO DEL TOXOIDE TETANICO POR SULFATO DE SODIO. -- Estudiamos el posible fraccionamiento del toxoide tetánico (aparte el diftérico) por precipitación con sulfato de sodio seco y anhidro a diferentes concentraciones. Una vez agregada la sal a 35° C. para facilitar su disolución, se mantuvo a [$\pm 3^\circ$] C en cámara fría durante 2 horas y se centrifugó. Damos los resultados obtenidos con dos toxoides tetánicos, uno 10 veces concentrado (una precipitación alcohólica) y otro 12.5 veces (dos precipitaciones alcohólicas). (Tabla I).

TABLA I
PRECIPITACIONES DEL TOXOIDE TETANICO POR SULFATO DE SODIO

TOXOIDE	SO_4Na_2 %	mg N/ml	Valor	Lf/mg N
10 veces concentrado (una sola concentración alcohólica).	—	0.378	25 Lf	66
	8	0.033	no flocula	—
	10	0.044	no flocula	—
	12	0.049	no flocula	—
	12	0.049	no flocula	—
	15	0.063	24 Lf	380
	18	0.098	24 Lf	245
12.5 veces concentrado (dos concentraciones alcohólicas).	—	0.266	31 Lf	116
	8	0.049	no flocula	—
	10	0.061	no flocula	—
	12	0.091	27.7 Lf	304
	15	0.134	27.7 Lf	206
	18	0.168	27.7 Lf	165

Los toxoides tetánicos nativos contenían de 1.8 a 2.0 Lf por mg. de N. El primer toxoide obtenido por una sola concentración por alcohol etílico, elevó su valor a 66 Lf por mg. de N. Con 15 % de SO_4Na_2 el precipitado redisolto a igual volumen da 380 Lf por mg. de N. Con mayor cantidad de sulfato la pureza disminuye. En el otro toxoide si bien la relación de purificación inicial es mayor (116) alcanza el máximo de pureza con 12 % de SO_4Na_2 .

Cotejando los valores salta a la vista que no es necesario concentrar dos veces el toxoide por alcohol, siempre que finalmente se lo precipite con sulfato de sodio al 15 %.

Como no se observaran pérdidas por este método, estamos en presencia de un procedimiento simple que permite obtener un toxoide apto para la vacunación antitetánica con sólo una precipitación alcohólica, seguida de otra con sulfato de sodio al 15 %, eliminando el sulfato finalmente. Aún no hemos estudiado el valor de este toxoide como vacuna en animales y los datos que figuran en este trabajo se refieren al toxoide precipitado dos veces por alcohol etílico. Es interesante observar que los toxoides con 8 y 10 % de sulfato de sodio no dan valor floculante y que la relación de purificación con más de 12 % de sulfato disminuye.

FRACCIONAMIENTO DEL TOXOIDE DIFTERICO POR SULFATO DE SODIO. — También ensayamos la purificación del toxoide diftérico por sulfato de sodio. Comenzamos precipitando directamente el toxoide nativo con sulfato de sodio. Luego ensayamos la ulterior purificación con sulfato de un toxoide purificado una vez por alcohol y de otro purificado por alcohol y ácido. Como se verá no mejora mucho la relación de purificación.

La precipitación directa del toxoide nativo con sulfato de sodio se hizo a pH 3.8 y da una relación de purificación relativamente baja pasando de 11 Lf por mg. de nitrógeno, a valores que oscilan entre 400 y 750 Lf por mg. de nitrógeno. (Tabla II).

TABLA II
PRECIPITACION DEL TOXOIDE NATIVO POR SULFATO DE SODIO

TOXOIDE	SO+Na ² %	mg N/ml	Valor	Lf/mg N	Pérdidas
Nativo N.º 2092 ..	—	4.06	44.6	11	—
(10 veces conc.) ..	8	0.47	362.5	770	18.8
..	10	0.525	362.5	690	18.8
..	12	0.64	414	650	7.2
..	15	0.94	414	440	7.2

El toxoide purificado por una sola precipitación por alcohol y fraccionado seguidamente con sulfato da los valores de la tabla III.

TABLA III
TOXOIDE PURIFICADO POR ALCOHOL Y FRACCIONADO
POR SULFATO DE SODIO

TOXOIDE	SO ⁴ Na ² 4 %	mg N/ml	Valor (Lf)	Lf/mg N	Pérdidas
Nativo N.º 2118 ..	—	3.59	52	14.4	—
Concentrado por al- cohol. (10 veces)	—	1.21	480	396	7.7
	8	0.154	240	1510	5.4
	10	0.16	240	1500	5.4
	12	0.17	240	1410	5.4
	15	0.23	320	1320	38.5
	18	0.28	360	1275	30.8
Concentración ácida de la alcohólica .	—	0.267	480	1800	7.7

Con una concentración por alcohol, el toxoide N^o 2118 sólo da 396 Lf por mg. de nitrógeno. Se obtienen valores de purificación muy buenos con 12 y 15 % de sulfato de sodio, pero las pérdidas son grandes. *La concentración ácida seguida a la alcohólica da una relación de purificación excelente (1800) con sólo una pérdida de 7.7 %.*

Esto demuestra una vez más que sólo es necesario precipitar una vez al toxoide diftérico por alcohol y luego concentrarlo de nuevo por ácido, lo que confirma nuestros trabajos anteriores ya citados. En la Tabla IV damos los valores obtenidos con un toxoide purificado por alcohol y ácido y fraccionado por sulfato de sodio. Este era un toxoide que daba buena relación de purificación (1100) y poco mejora con el fraccionamiento con sulfato.

TABLA IV
TOXOIDE DIFTERICO PURIFICADO POR ALCOHOL Y ACIDO
Y FRACCIONADO POR SULFATO

TOXOIDE	SO ⁴ Na ² %	mg N/ml	Valor	Lf/mg N	Pérdidas %
Nativo N.º 2092 ..	—	4.06	44.6	11	—
Concentrado	—	0.308	340	1100	23.8
	8	0.154	—	—	—
	10	0.160	—	—	—
	12	0.115	130	1130	61.8
	15	0.143	160	1120	53
	18	0.175	230	1300	32.4

Concluyendo esta parte podemos decir que el fraccionamiento con sulfato de sodio en la forma como lo hemos realizado no da una relación de purificación mejor. Aparte de ésto, la pérdida es muy grande como se puede

ver. Por lo tanto el método consiste en una purificación por alcohol etílico, seguida de una precipitación ácida en la zona isoelectrica del toxoide.

ELECTRODIALISIS DE TOXOIDES DIFTERICO Y TETANICO.
— Los toxoides fueron previamente dializados, luego electrodializados con el electrodializador modelo Pauli con electrodos de platino (anodo) y plata (catodo). El voltaje era regulado en tal forma que no pasaran más de 40-50 miliamperes.

Por las cámaras anódicas y catódicas se hacía pasar continuamente agua destilada. Al final de la electrodiálisis con 220 volts sólo pasaban de 10 a 20 M.A.

Se calculó la dilución que se presentaba por ósmosis y se midieron por floculación los toxoides diftéricos y tetánico. Dializamos y luego electrodializamos un toxoide diftérico purificado por el procedimiento alcohol-ácido. Después de la diálisis el volumen aumentó de 80 ml. a 130 ml. Electrodiálizamos 80 ml. del anterior y el precipitado por electrodiálisis redisuelto a igual volumen contenía 200 Lf. El líquido sobrenadante con agua de lavado correspondía a un volumen de 110 ml. y daba 25 Lf. No hay destrucción del principio activo por este método, pero la relación de purificación se mantiene constante.

TABLA V
ELECTRODIALISIS DEL TOXOIDE DIFTERICO

PROCEDIMIENTO	mg N/ml	Lf/ml	Lf/mg N	Lf totales de las fracciones
Concentrado por alcohol ácido	0.308	340	1100	—
y dializado y electrodializado	0.235	230	1000	18.400
líquido sobrenadante.	0.17	200	1170	16.000
	0.056	25	520	2.700

ELECTRODIALISIS DEL TOXOIDE DIFTERICO

En estos ensayos preliminares la electrodiálisis no nos ha dado resultado satisfactorios, pues la relación de purificación se mantiene constante.

La electrodiálisis del toxoide tetánico produce una precipitación. En este precipitado se encuentran las dosis floculantes totales. El líquido sobrenadante no con-

tiene el principio activo. En un próximo trabajo daremos las relaciones de purificación encontradas.

ENSAYO DEL PODER VACUNANTE DE LOS TOXOIDES. Toxoide Tetánico: Toxicidad. — A 5 cavias de 250 gr. cada uno se le inyectaron 0.5 ml. (31.2 Lf) de toxoide tetánico vía sub-cutánea y 0.5 ml. vía intramuscular. Estos animales sobreviven más de 20 días sin presentar síntomas de tétano.

Valor antigénico. — Se inyectaron 3 Lf del toxoide tetánico vía sub-cutánea a 30 cavias de 250 gr. cada uno. A 10 cavias a las 6 semanas se inocularon 10 d.m.m. de toxina tetánica vía intramuscular y sobreviven más de 20 días sin presentar síntomas de tétano. A otros diez se le inocularon 20 d.m.m. y tampoco presentaron síntomas tetánicos. A los últimos diez cavias restantes se le inocularon 40 d.m.m. de toxina y sólo tres cavias presentaron síntomas de tétano, pero sobrevivieron más de 20 días. Los testigos (sin vacunar) murieron antes de las 24 horas. Nuestra vacuna tetánica tiene un excelente poder vacunante ya que las indicaciones establecen que 1 ml. del material a las 6 semanas debe proteger el 80 % de los cavias después de una inyección de 10 d.m.m. de toxina.

Toxoide diftérico: Toxicidad. — Inoculando cavias con una cantidad igual a 10 veces la dosis humana, no produce fenómenos tóxicos en los 30 días subsiguientes.

Valor antigénico. — Hasta el presente se aceptaba, que la dosis inicial humana (30 Lf) debía proteger el 80 % de los cavias que recibieran 5 d.m.m. de toxina, a las 6 semanas de vacunados. Utilizando nuestra vacuna con el hidrato de aluminio correspondiente vacunamos 30 cavias con sólo 5 Lf. A las 6 semanas de vacunados soportaron 100 y 200 d.m.m. de toxina diftérica, presentando edema que desaparece a los 10 días sobreviviendo todos. Los testigos sin vacunar mueren antes de las 20 horas. Antes de la inoculación de la toxina diftérica fué medido el valor antitóxico de los plasmas de los cavias, dando más de 2 u. a. y menos de 3 u. a.

Estas experiencias sobre el poder vacunante prueban claramente que hemos obtenido toxoides diftérico y tetánico de gran eficacia.

RESUMEN

Se describe la técnica que utilizamos para obtener toxoides diftérico y tetánico de gran pureza y por lo tanto aptos para la vacunación humana.

A continuación se estudia el fraccionamiento del toxoide tetánico purificado por alcohol, con sulfato de sodio a distintas concentraciones, consiguiendo una buena purificación con una precipitación con sulfato de sodio al 15 %. Se llega a un valor que oscila entre 350 y 400 Lf por mg. de nitrógeno.

El fraccionamiento con sulfato de sodio del toxoide diftérico ya concentrado da buena relación de purificación, pero las pérdidas son relativamente elevadas.

La mejor purificación se obtiene por una precipitación alcohólica seguida de una ácida en su zona isoelectrica, llegándose a valores de 1800 Lf por mg. de nitrógeno con sólo una pérdida del 7,7 %.

Empleando la electrodiálisis no conseguimos mejorar la relación de purificación de estos toxoides.

El valor antigénico de los toxoides tetánico y diftérico purificados, como se puede ver en el capítulo correspondiente, sobrepasan ampliamente las exigencias de los métodos en uso.

SUMMARY

The technique used to obtain diphtheric and tetanic toxoids of great purity, apt for human vaccination is described.

Forthwith, the fraction of the tetanic toxoid purified by alcohol with sodium sulphate at different concentrations has been studied, obtaining a good purification by precipitation with 15 % sodium sulfate. A value is obtained between 350 and 400 Lf for mg. of nitrogen.

Fractional precipitation with sodium sulfate of the already concentrated diphtheria toxid gives a good purification, but the loss is relatively high.

The best purification is obtained by an alcoholic precipitation, followed by an acid precipitation in its isoelectric zone, reaching values of 1800 Lf for mg. of nitrogen with a loss of only 7,7 %.

The purification of these toxoids could not be improved by using the electro dialysis.

The antigenic value of the purified tetanic and diphtheric toxoids exceeds largely the requirements of the methods in use.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F. MODERN, G. RUFF Y A. GATTI — *Rev. Soc. Arg. Biol.* 24, Nº 3 (1948). 26, 251 (1951). — *Rev. Inst. Bact.* 13, 210, 320, 341, (1948).
- (2) H. GOLDIE, C. PARSON Y M. BOWERS — *J. Infect. Dis.* 71, 212; (1949).
- (3) V. ROSS — *J. of Immunol.* 63, 183, (1949).
- (4) LEVINE, WYMAN Y EDSALL. — *J. of Immunol.* 63, 219 (1949).