

## Sobre la obtención de sueros purificados

Por A. SORDELLI, F. MODERN, G. RUFF, I. GVIRTZMAN y J. FERRARI

---

Dos motivos principales han guiado los ensayos de purificación de los anticuerpos: el conocimiento de su naturaleza y la obtención de sueros desprovistos de propiedades tóxicas para el hombre. Apenas iniciada la sueroterapia fué observada la enfermedad del suero y el shock proteico o shock del suero.

La aplicación del suero se vió limitada de una manera inesperada tanto en lo tocante a la repetición de las aplicaciones cuanto a las vías de inyección.

Con el objeto de evitar o disminuir los accidentes se han aconsejado y empleado métodos innumerables que consistían en modificaciones del suero (envejecimiento, calentamiento, fraccionamiento, etc.), en el empleo del suero de otras especies (bovino), y en la profilaxis o la terapéutica de las enfermedades producidas por el suero (investigación de la sensibilidad, desensibilización, tratamiento de la enfermedad del suero y medicación sintomática).

Al Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene le ha tocado ser actor principal en este asunto, por la razón de ser el mayor productor de suero en la Argentina y de ser el organismo oficial encargado de ello.

Uno de los autores tiene la responsabilidad directa de esa producción desde hace 25 años y no ha dejado de oír en todo ese tiempo las quejas más diversas respecto de los sueros preparados en el Instituto.

Corresponde tratar en este caso de las enfermedades provocadas por el suero y únicamente de ello nos ocuparemos, sin mencionar siquiera el problema de la actividad, lo cual exige un planteo muy diferente y una solución que apenas se vislumbra.

Por lo tanto sólo recordaremos que el suero del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene ha sido incriminado de producir mucha más enfermedad del suero que cualquiera de los otros utilizados en el país y aunque hayamos creído así, y hasta encontrado justificación para que así haya sucedido, no hemos tenido ocasión de ver cifras comparativas que permitieran fundar con criterio objetivo la supuesta diferencia.

Decimos que encontramos justificación a la mayor frecuencia de la enfermedad del suero producida por los sueros elaborados en el Instituto sólo por razones de analogía. En efecto, los sueros distribuidos son de reciente preparación, pues nunca se ha podido formar y mantener un gran stock, y porque no se han podido aplicar nunca procedimientos de preparación más perfectos que el usado desde hace poco menos de 20 años.

La justificación de estos dos hechos debe buscarse en razones de orden económico, que no es necesario analizar, pues son obvias y su examen no tendría objeto.

## I

La sueroterapia, la antitóxica especialmente, tiene un fundamento experimental que hace relativamente fácil resolver el asunto del conocimiento de la actividad del suero, de manera que los problemas inmediatos que se presentan a los que lo elaboran, son los del costo de producción y la pureza. En lo primero el Instituto Bacteriológico cree estar en una posición excepcional con relación a todos los establecimientos de elaboración y dentro de poco tiempo daremos a conocer los resultados de nuestras experiencias de más de 20 años.

En cuanto a la pureza, en lo que poco hemos adelantado, es necesario hacer algunas reflexiones para abordar el asunto con mejor sentido de la realidad.

La sueroterapia fué recibida como una medicación poco menos que infalible, y el exceso de optimismo hizo volver, por compensación, a los clínicos al juicio opuesto. Sin embargo como la idea y los principios de la sueroterapia tenían casi valor axiomático, los fracasos fueron imputados al suero usado. Esto que debe considerarse por ahora, solo como una intuición de que algo de eso sucede, y no como un hecho demostrado, fué expresado con más frecuencia a medida que transcurría el tiempo desde el descubrimiento de BEHRING, tiempo durante el cual se fué formando juicio

del peligro y de los graves inconvenientes del uso del suero de caballo, en el hombre.

Precisamente ésta fué la causa que impulsó a los que fabricaban el suero a mejorarlo en su inocuidad y eso justifica la boga que ha tenido en todo el mundo el empleo del suero purificado que fué preparado para reducir la incomodidad y sufrimiento del paciente cuando se inyectan grandes cantidades de suero y el mayor padecimiento ocasionado por la « enfermedad del suero ».

A medida que se conoció mejor esta enfermedad y se la pudo atribuir con fundamento al fenómeno de inmunidad determinado por la introducción de proteínas extrañas, la purificación del suero tuvo mucho más justificación, sobre todo cuando los métodos experimentales probaban que la actividad era por lo menos igual, cuando no mayor, que la del suero nativo.

Un suero debe ser purificado si se obtienen algunas de las siguientes ventajas: *a*) produce menor reacción local, *b*) se absorbe más fácilmente (más rápidamente), *c*) puede inyectarse sin peligro de shock proteico (shock del suero), por vías más efectivas, *d*) produce menos enfermedad del suero, *e*) se conserva más tiempo sin alteración de su aspecto y de su valor.

El obstáculo que se opone al uso general de la purificación es de orden económico; los sueros purificados son más caros, pues al mayor costo de las operaciones se suma el de las grandes pérdidas durante la elaboración. En general puede decirse que un suero bien purificado cuesta hasta el doble por esas causas.

En el caso particular del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene, que carece de un sistema financiero fabril, este asunto adquiere proporciones tales que se torna insoluble. Basta con tener presente que en la actualidad, con 700 caballos no se puede producir el suero reclamado por el país y que el personal apenas alcanza para elaborar el suero producido, para que se vea que el problema de purificar el suero es insoluble.

Como dato ilustrativo diremos que el valor de solo dos sueros distribuidos, el diftérico y el tetánico, alcanza a la cifra de 4.000.000 de pesos por año.

Estando suficientemente fundada la necesidad de purificar los sueros, expondremos brevemente un resumen de los métodos y de los antecedentes del tema, que constituyen específicamente el objeto de esta memoria.

## II

Los métodos utilizados en la purificación son:

a) Métodos fundados en la separación de las fracciones proteicas del suero por medio de sales.

Después de las primeras tentativas de fraccionamiento del suero hechas por TIZZONI y CATTANI en 1891 y de BRIEGER y EHRLICH en 1893, por medio de sales alcalinas FULD y SPIRO (1900), describen la existencia de las eu y pseudoglobulinas a más de las albúminas y desde entonces el examen de la distribución de los anticuerpos se hace sobre una base más adecuada, tal como lo realizaron E. P. PICK en 1902. PINKUS y BRUNNER en 1907, descubren un método sencillo, económico e ingenioso, por el uso del sulfato de sodio; estudiado por nosotros fué aplicado en el Instituto Bacteriológico desde hace muchos años (SORDELLI y FERRARI) y es utilizado hasta la fecha.

En Norte América, GIBSON (1907) y GIBSON y BANZHAF (1908-1919) dan las bases de los actuales métodos industriales utilizados en muchos laboratorios. Estos métodos suman a la separación por sales, la acción del calor, que es utilizada por A. HOMER (1916-1920) después de estudiar la influencia de la temperatura, pH y las sales. Este método fué aplicado durante un tiempo en el Instituto (SORDELLI, 1918).

b) Métodos fundados en la coagulación diferencial.

Aunque en el método de BANZHAF y en el de HOMER el calentamiento se emplea para desnaturalizar las proteínas no antitóxicas que son más sensibles, debemos considerar a FROUIN como el iniciador de este método (1910) que BESREDKA, diez años más tarde, aplicó modificándolo. WERNICKE y MODERN (1930) han estudiado el método de FROUIN confirmando los resultados de ese autor; aunque estos métodos no se hayan utilizado constituyen antecedentes de los que se describen más adelante.

c) Métodos fundados en la adsorción.

Ya en 1893, BRIEGER, empleó las sales de zinc para precipitar las antitoxinas, y más tarde ARONSON (1893), MARSHALL y WELCKER (1913) la adsorción sobre alúmina y en 1913 NEBEL, la adsorción sobre kaolin. WERNICKE y MODERN (1928) aplican el procedimiento sin grandes resultados.

El uso de sulfato de aluminio y potasio fué introducido por FREUND y STEINBERG para precipitar proteínas no antitóxicas. Es digno de mencionar que su empleo sirve de base a métodos de purificación utilizados en la actualidad.

d) Métodos por fraccionamiento por disolventes orgánicos.

HARDY y GARDINER (1910) por el empleo del alcohol y la acetona a muy baja temperatura y PIETTRE y VILA (1920) más tarde, por un procedimiento semejante fraccionan las proteínas antitóxicas y obtienen alguna purificación.

e) Métodos de diálisis, electrodiálisis y electroósmosis.

Son procedimientos que se han aplicado para eliminar las sales, para precipitar las globulinas no antitóxicas o las antitóxicas y para separarlas por el diferente transporte de las proteínas en un campo eléctrico.

Un procedimiento llamado de electroósmosis tuvo cierta boga. (RUPPEL).

La ultra filtración, de poca aplicación para separar las proteínas nativas del suero, tiene utilización cuando se trata de eliminar proteínas no coagulables de menor peso molecular.

Un procedimiento fundado en la poca solubilidad, en ausencia de sales, de los anticuerpos contra el antígeno hidrocarbonado del *Dipl. pneumoniae* fué descrito por FELTON (1925-1930); también precipitan análogos anticuerpos para otras bacterias. Este autor introduce además un método de separación de una substancia que es responsable de las reacciones inmediatas del shock del suero cuando se practican las inyecciones por vía venosa.

SAVINO (1932) en el Instituto Bacteriológico aplicó esta parte del método de FELTON con buen resultado a los sueros antitóxicos.

f) La combinación con el antígeno.

Ha sido utilizada para separar el anticuerpo de las demás proteínas hace mucho tiempo y HUNTOON en 1921 aplicó el procedimiento en gran escala para la elaboración de sueros antimicrobianos purificados.

El método cobra interés por el descubrimiento de RAMÓN acerca de la precipitación de la antitoxina por la toxina y la disociación del precipitado separando la toxina por la adición de ácido y por calentamiento.

Como se comprenderá este procedimiento no ha alcanzado aplicación industrial y es poco verosímil que la alcance; constituye sin embargo el procedimiento de elección para el estudio de las

propiedades de la antitoxina. Con ese procedimiento RAMÓN (1913) obtiene una antitoxina de 60.000 unidades por gramo, y LOCKE y MAIN (1926), WERNICKE y MODERN (1930) confirman esa cifra; MARRACK y SMITH (1930) calculan un valor de 90.000 y PAPPENHEIMER, ROBINSON (1937) el de 100.000.

g) La acción de las enzimas digestivas sobre los anticuerpos. Ha sido estudiada muchas veces y la literatura antigua (PRÖSCHER, PICK, JACOBY, 1902-1909) prueba que los anticuerpos antitóxicos son bastante resistentes a la acción de enzimas proteolíticas y especialmente a la tripsina y la papaína. Estos trabajos, que permitieron obtener antitoxina no fueron utilizados para la preparación de la antitoxina para uso humano sino más bien para demostrar la imposibilidad de obtener antitoxinas libres de proteínas coagulables.

Sobre el uso industrial de estos métodos POPE (1939) cita la patente inglesa de IMRAY (1902) sobre un método de purificar antitoxinas por la digestión con pepsina o tripsina.

De esta enunciación brevísima es fácil ver la preocupación de conseguir anticuerpos purificados y que el esfuerzo realizado para alcanzarlo no ha sido afortunado. Además es notorio que las fábricas de suero o mantienen secretos sus procedimientos o los protegen por patentes, de manera que los resultados obtenidos con los sueros no pueden servir para juzgar de tal o cual procedimiento de purificación, sino tan solo para saber de los sueros de determinada marca, cosa que ha sido un obstáculo al progreso de esta rama de la terapéutica.

Al conocimiento de estos métodos y a su adaptación a la práctica ha contribuido el Instituto por las investigaciones de SORDELLI, FERRARI, WERNICKE, MODERN, SAVINO y RUFF, desde el año 1918 hasta el presente. La mayor parte de esos estudios se encuentran publicados en esta Revista.

En forma de resumen puede decirse, que no existe ningún procedimiento conocido que permite obtener sueros que no determinen la « enfermedad del suero » y que ninguno de los que son comercialmente aplicables permiten una purificación de más de 2 veces. (\*).

(\*) La concentración del suero a un menor volumen y la purificación permiten aumentar la cantidad de antitoxina por cm<sup>3</sup> hasta 4 y más veces el valor del suero original.

## III

A pesar del permanente interés nuestro por el problema, pocos eran los incentivos para iniciar un cambio fundamental de métodos y menores aún las posibilidades, por insuficiencia del instrumental, personal y recursos. En 1936 el Dr. EICHHORN informó al Jefe de preparación de sueros, Dr. PIROSKY, de un método utilizado en los Laboratorios de Lederle que consistía en la digestión del suero y la adsorción ulterior con fosfato de calcio, datos confirmados por una carta y por el envío de muestras del mismo suero; información que fué puesta en conocimiento de uno de los autores (SORDELLI) antes de emprender viaje a los Estados Unidos. En el mes de diciembre del mismo año fué obtenido por la generosidad del Director de los laboratorios Lederle, Dr. BEARD y del propio descubridor del procedimiento, PARFENTJEV, suficiente información para iniciar los estudios en Buenos Aires, y de poco tiempo después data el comienzo de los estudios realizados en el Instituto por MODERN y RUFF. La casa Lederle ha protegido la producción del suero por dos patentes (2.065.196 y 2.123.198).

Un nuevo horizonte abre, dos años más tarde, la publicación de POPE (1938) sobre la coagulación diferencial de proteínas previamente modificadas por enzimas proteolíticas; en el mismo año pudimos conocer de visu (SORDELLI), las instalaciones y una sucinta exposición de los métodos utilizados por POPE en los Wellcome Physiological Laboratories. Los procedimientos no están protegidos por patente pero como no se conocen los detalles precisos de la técnica, sólo estudios sistemáticos podían permitir la solución práctica del problema.

Estos estudios fueron iniciados simultáneamente en dos laboratorios, por el Dr. MODERN y RUFF y por el Dr. SORDELLI en colaboración con I. GVIRTZMAN y J. FERRARI. Desde febrero de 1939 hasta la fecha se han proseguido los estudios y recién ahora estamos en posesión de una técnica suficientemente simple para ser aplicada industrialmente.

Los procedimientos de PARFENTJEV y de POPE tienen algo en común, de modo que es difícil juzgar si los derechos creados por las patentes (2.065.196 - 2.123.198), de Lederle son violados por la aplicación del método de POPE desde el punto de vista legal. Como a nuestro entender se trata de procedimientos diferentes en su parte esencial estimamos que el uso del método de POPE no invade los derechos creados por las patentes americanas, por lo menos en nues-

tro país, donde es menos rígido el sistema de protección por patentes de invención.

El método de PARFENTJEV consiste: 1º en la digestión del suero por pepsina a temperatura y pH convenientes, durante determinado tiempo. En esta etapa las antitoxinas, que resisten la digestión, quedan como proteínas coagulables, mientras las demás proteínas se digieren; hoy sabemos que también se digieren parcialmente las antitoxinas. 2º En este momento el suero digerido contiene a más de las antitoxinas, la enzima, las proteínas no coagulables, sales y otras sustancias solubles; por ultrafiltración a través de colodio acético se eliminan las proteosas y por adsorción con fosfato tricálcico las enzimas y otras sustancias no antitóxicas.

La purificación (por contenido de antitoxina en cada unidad de proteína total) es de tres y más veces.

El método de POPE está fundado en las siguientes particularidades: por la acción de las enzimas proteolíticas, a pH y temperaturas adecuadas, la molécula de antitoxina se fracciona rápidamente en dos partes casi iguales, una de ellas, que contiene toda la antitoxina y la otra, desprovista de valor; esto, que ocurre en corto tiempo, ha transformado a la antitoxina en una proteína menos coagulable por el calor que las otras del suero, de modo que el calentamiento en presencia de sales a pH y temperatura adecuados, coagula todas las proteínas inertes y deja en solución a la antitoxina. A ésta se la puede separar por precipitación por sales de la manera corriente; se termina la elaboración por diálisis para eliminar las sales.

Un examen de los dos procedimientos revela que la base del método de POPE es la misma que la del método de PARFENTJEV en cuanto se considera la acción de una enzima proteolítica y la resistencia a la digestión de la antitoxina. Esto tiene antecedentes en la literatura y además según POPE, la patente de IMRAY (B.P. 18.340, 1902) es para obtener antitoxina por digestión enzimática, de manera que quedaría eliminado el obstáculo de las patentes sobre el empleo de la digestión en la purificación de antitoxina.

A partir de ese momento, el método de POPE y el de PARFENTJEV se disocian en el principio y en la técnica, de modo que no hay incompatibilidad por los derechos que acuerda una patente. En efecto, en este último, la digestión se prosigue hasta que el 70 a 80 % de la proteína se digiere, mientras en el de POPE, la digestión debe ser tan leve, cuanto sea necesaria para descomponer la molécula proteica de la antitoxina prácticamente en dos mitades. En el método de POPE la coagulación por el calor de todo lo que no es antitóxico, es lo esencial de la purificación y en el de PAR-



FENTJEV la precipitación salina, la ultrafiltración y la adsorción constituyen los recursos que permiten separar las fracciones digeridas, de la antitoxina. La precipitación salina sólo se emplea en el método de POPE, para precipitar las proteínas antitóxicas y para separar algunas fracciones digeridas.

Creemos suficientemente explicada la diferencia entre ambos métodos y justificado el empleo del método de POPE sin invadir los derechos de PARFENTJEV, creados por sus patentes.

MODERN y RUFF han estudiado el método de PARFENTJEV y han publicado sus resultados en varios trabajos, (ver esta Revista). Con esas informaciones es posible obtener los sueros tal como se puede deducir de las patentes de PARFENTJEV.

El uso de esos sueros lo hemos limitado a experimentos en animales y algunos pocos en el hombre, que no contradicen ninguno de los resultados conocidos acerca de las antitoxinas fabricadas en los Estados Unidos por las patentes de PARFENTJEV.

El método de POPE a pesar de la publicación del autor, fué de más difícil utilización y sólo después de un número considerable de experimentos, se pudo llegar a fijar las condiciones de una técnica industrialmente aplicable.

Ya MODERN y RUFF, han comunicado sus investigaciones acerca del método de POPE y sus trabajos pueden ser considerados como una adaptación de dicho método; actualmente se utiliza un procedimiento distinto del descripto.

La obtención de antitoxina purificada por cualquiera de los dos métodos (PARFENTJEV o POPE) indujo a varios investigadores (PAPPENHEIMER, ROBINSON y POPE) a emplearla para precipitarla por la toxina para conseguir una mayor purificación y alcanzar si fuera posible, la obtención de una antitoxina pura, es decir, la especie química. Las cifras de POPE, de PAPPENHEIMER y ROBINSON, demuestran que la actividad de la antitoxina precipitada por la toxina es dos veces mayor en el caso de los sueros tratados por enzimas proteolíticas que en los sueros sin tratar. Los valores son de 60.000 a 90.000 unidades por gramo de proteína y de 140.000 respectivamente.

Recientemente NORTHROP ha obtenido la antitoxina por este procedimiento cuyas propiedades satisfacen las exigencias de una proteína pura. Algunas muestras se han obtenido en forma cristalina (agujas y láminas). Su peso molecular es aproximadamente de 80.000.

Aparte de este progreso en el conocimiento de la naturaleza de la antitoxina, la preparación de las antitoxinas por los procedimientos mencionados, de acuerdo a la literatura, constituye un

gran paso dado hacia la desaparición de la enfermedad del suero. Si esto se hubiese conseguido, se habría realizado uno de los grandes progresos de la sueroterapia.

Fué con esta ilusión que se emprendieron todos los estudios desde el año 1937, y con igual ilusión se aplicó al hombre el suero preparado por el método de POPE. La justificación de ese optimismo se encuentra en el trabajo que sigue a continuación.