

Purificación de toxoide diftérico obtenido en medio simplificado

Por PIROSKY IG., y PIROSKY R. de

La toxina diftérica no puede purificarse mediante la precipitación en su punto isoelectrico (P. I.) por su marcada sensibilidad a la acción del ión H. Este método, en cambio, ha sido aplicado con buenos resultados a la purificación del toxoide (*).

En este trabajo hemos estudiado la marcha de la recuperación de los valores Lf y dosis mínima mortal (d. m. m.) de una toxina precipitada a P. I. a medida que avanza la detoxificación por el formol, y al mismo tiempo, sobre la base de considerar el valor 0,46-0,55 de gama de N/Lf [Pappenheimer (1) - Eaton (2)] como el límite de concentración de las propiedades de la toxina con respecto al substratum nitrogenado, y suponer que la acción del formol sobre la molécula de toxina no incide sobre la magnitud de ésta, hemos ahondado también el problema de la purificación del toxoide por el método de la precipitación en punto isoelectrico, en el sentido de conseguir para el toxoide valores N/Lf del mismo orden que los obtenidos por los autores arriba citados al trabajar en toxina diftérica.

Para ello empleamos toxina producida en medios simplificados y sus correspondientes toxoides, con los cuales hemos determinado o logrado:

- A) La zona de precipitación de toxoide.
- B) La relación entre detoxificación por el formol y recuperación en el punto isoelectrico.
- C) La purificación del toxoide.

(*) La precipitación por ácido ha sido aplicada por SORDELLI, SAVINO y FERRARI para la concentración y purificación del antígeno que se emplea en este Instituto para la preparación de la vacuna antidiftérica. *Rev. del Inst. Bact. Dto. Nac. Hig.* 6: 687-718, 1935.

A) LA ZONA DE PRECIPITACIÓN DEL TOXOIDE

1. *Máxima precipitación.* — Se ha determinado la máxima precipitación de toxoides elaborados en el medio de Pappenheimer (3) —toxoides P— y en el medio de Mueller (4) —toxoides M— para una escala de pH entre 5,6 y 3.

TABLA I

Zona de precipitación de toxoide

Tubo	Toxoide	pH	Floculación		
			15 minutos	30 minutos	24 horas
1	Toxoide P. 5 c.c. en cada tubo	5,6	—	—	—
2		5,2	—	—	—
3		4,8	—	—	—
4		4,6	opalesc.	floc. fina	floc. fina
5		4,3	floc. fina	» gruesa	depósito
6		4,1	» gruesa	depósito	»
7		4,-	» »	»	»
8		3,9	» »	»	»
9		3,8	» »	»	»
10		3,7	» »	»	»
11		3,4	» »	»	»
12		3,-	» »	»	»
13	Toxoide M. 5 c.c. en cada tubo	5,6	—	—	—
14		5,2	—	—	—
15		4,8	—	—	—
16		4,6	opalesc.	floc. fina	floc. fina
17		4,3	floc. fina	» gruesa	depósito
18		4,1	» gruesa	depósito	»
19		4,-	» »	»	»
20		3,9	» »	»	»
21		3,8	» »	»	»
22		3,7	» »	»	»
23		3,4	» »	»	»
24		3,-	» »	»	»

Estos toxoides se obtuvieron por acción del formol sobre toxinas que tenían las características siguientes:

Toxina P.: 34 Lf \times cm³; 2.000 d. m. m. \times cm³; L⁺ = 0,045 cm³ y 58 gamas de N/Lf. Se transformó en toxoide por adición de 3 % de formol — 15 días a 35°C.

Toxina M.: 55 Lf \times cm³; 1.667 d. m. m. \times cm³; 44 gamas de N/Lf.

Se transformó en toxoide por adición de 2^o/_{oo} de formol — 15 días a 35°C.

La zona de precipitación se determinó agregando a 5 cm³ de toxoide la cantidad de ácido sulfúrico al 2% hasta obtener los pH indicados en la tabla I. Se deja en reposo y se observa periódicamente la formación de floculado durante las primeras 24 horas.

La zona de floculación de los toxoides P. y M. de acuerdo a la tabla que antecede se extiende desde pH 4,6 a pH 3 (mínimo estudiado).

2. *Rendimiento en Lf.* — Se ha estudiado el rendimiento en Lf de cada uno de los precipitados obtenidos en la escala de pH arriba indicada. A una serie de tubos que contienen un volumen dado de toxoide (tabla II) se agrega ácido sulfúrico al 2% hasta obtener los puntos de dicha escala de pH (¹). Esta operación se realiza entre 0 y 5°C. Después de permanecer durante 30 minutos a esta temperatura, se centrifuga 15 minutos. El líquido sobrenadante es separado y el tubo de centrifuga se invierte sobre papel de filtro a fin de escurrir el líquido residual. El precipitado se redisuelve en un solvente constituido por una parte de una mezcla de buffer de fosfato a pH 7,6 y cuatro partes de solución fisiológica, hasta completar la mitad del volumen original. Sobre esta nueva solución se calcula el rendimiento de la primera precipitación.

El líquido sobrenadante que se ha separado después de la primera precipitación, así como aquellos toxoides que no han floculado, se llevan por nueva adición de ácido sulfúrico a pH 3,0. Después de dejar en reposo 15 minutos, centrifugar, decantar y redissolver el nuevo precipitado en la forma arriba indicada, se calcula el rendimiento de esta segunda precipitación (tabla II).

En la primera precipitación el rendimiento es de 78 a 82% a partir de pH 3,8. A medida que se eleva el pH el rendimiento disminuye hasta anularse a pH 5,2. En una segunda precipitación a pH 3,0 de todos los líquidos residuales, se observa que por debajo de pH 3,8 inclusive, los líquidos permanecen claros, por haberse agotado el principio activo en la primera precipitación, obteniéndose, en cambio, un rendimiento progresivo desde pH 4,0

(*) En algunos experimentos la escala de pH ha sido obtenida por mezcla buffer Mc Ilvaine; pero como los rendimientos en Lf eran del mismo orden que los obtenidos por precipitación en medio ácido, empleamos en lo sucesivo este último procedimiento.

hasta 5,6. Por tanto, pH 3,8 representa el punto de máxima precipitación de substancia activa (consideraremos este pH como punto isoelectrico).

TABLA II
Rendimiento en Lf.

Tubo	Toxide	pH	1ª precipitación	2ª precipitación a pH 3	Rendimiento %.	
					1ª pp.	2ª pp.
1	Tox. P.	5,6	—	20 cc. a 50 Lf	—	75
2		5,2	—	20 » » 50 »	—	75
3	40 c.c.	4,6	20 cc. a 22 Lf	10 » » 55 »	33	41,6
4	a 34 Lf	4,3	20 » » 35 »	10 » » 45 »	50	33
5	= 1360 Lf	4,1	20 » » 35 »	10 » » 40 »	50	30
6	en cada tubo	4,-	20 » » 42 »	10 » » 18 »	67	12,5
7		3,9	20 » » 47 »	—	70	—
8		3,8	20 » » 55 »	—	82	—
9		3,7	20 » » 55 »	—	82	—
10		3,4	20 » » 55 »	—	82	—
11		3,-	20 » » 55 »	—	82	—
12	Tox. M.	5,6	—	20 cc. » 60 Lf	—	73
13		5,2	—	20 » » 60 »	—	73
14	30 cc.	4,6	20 cc. a 25 Lf	20 » » 37 »	30	35
15	a 55 Lf	4,3	20 » » 48 »	20 » » 27 »	50	33
16	= 1650 Lf en	4,1	20 » » 48 »	10 » » 25 »	60	15
17	cada tubo	4,-	20 » » 57 »	10 » » 16 »	70	10
18		3,8	20 » » 64 »	—	78	—
19		3,7	20 » » 64 »	—	78	—
20		3,4	20 » » 64 »	—	78	—
21		3,-	20 » » 64 »	—	78	—

3. *Determinación del Kf.* — Se estudió el Kf de los toxoides obtenidos a diferentes pH. La determinación se realizó sobre 25 Lf en volumen constante y a temperatura de 56°C. Prácticamente todos los toxoides de la serie floccularon en el mismo tiempo.

4. *Determinación del N/Lf.* — Se ha establecido el valor N/Lf sobre los toxoides obtenidos entre pH 4,6 a 3,0, determinándose el nitrógeno total (tabla III).

Estas determinaciones, realizadas con diferentes muestras de precipitados obtenidos a los pH que se indican, dan valores de N/Lf que oscilan entre 1,4 y 2,0, sin haberse observado una relación entre el valor mínimo y un pH determinado. Debemos hacer notar que estos valores han sido obtenidos sobre precipitados escurridos

y sin lavar. La diálisis de las soluciones de estos toxoides disminuye el valor de N/Lf en un 15 %.

TABLA III

N/Lf en gamas de los toxoides obtenidos en diferentes pH

	pH	4,6	4,3	4,1	3,8	3,4	3,—	
Toxoides P.	N/Lf	1,8	1,9	2	1,75	1,6	1,84	
» M.	»	1,8	2,—	1,9	1,82	1,65	1,72	
» primit. P. . .	»							58
» » M.								44

5. *Zona de precipitación, rendimiento en Lf y valor de N/Lf de toxoides dializados.* — Considerando la composición de los medios de cultivo utilizados para la obtención de los toxoides que estudiamos (toxoides P. y M.), la simple diálisis debe permitir la separación de la proteína activa junto con la proveniente de la desintegración de las bacterias, de los aminoácidos y sales que integran dichos medios, determinando por esta sola operación una reducción apreciable del N/Lf (tabla IV).

TABLA IV

N/Lf de toxoides simplemente dializados

Toxoides	Muestra	N/Lf	
		Sin dializar	Dializado
P.	1	58	5,3
P.	2	54	3,6
M.	1	46	4,1
M.	2	44	3,8

Estos valores de N/Lf obtenidos por simple diálisis de toxoides provenientes de medios simplificados son bastantes aproximados a los que se obtienen cuando se precipitan por ácido los toxoides elaborados en medios a base de agua de carne y peptona.

Determinamos sobre toxoides dializados P. y M. la zona de floculación, recuperación en Lf y valor de N/Lf entre pH 4,3 y 3,4. Como el toxoide dializado no precipita por acción de ión hidrógeno por falta de electrolitos, fué necesario antes de acidificar restaurar

la concentración de éstos, mediante agregado de 0,9 % de NaCl o bien efectuar la variación de pH por la adición de mezcla buffer Mc Illvaine. La zona de floculación es la misma que la del toxoide no dializado. En la tabla V se consigna el rendimiento en Lf y el valor N/Lf en los diferentes pH obtenidos ya sea por acción de ácido o por adición de mezcla buffer.

TABLA V

Rendimiento % en Lf, N/Lf de toxoide dializado a diferente pH

Precipitación por ácido: 20 cc. de toxoide + 2 cc. de NaCl 9 % + ácido sulfúrico 2 por mil hasta pH indicado. 15 minutos a 0°-5° C-centrifugación y redisolución del precipitado en mezcla de fosfatos y solución fisiológica a pH 7,6.
Precipitación por mezcla buffer Mc Illvaine: 20 cc. de toxoide + 4 cc. de buffer a pH indicado. 15 minutos a 0°-5° C procediéndose en la misma forma indicada en el párrafo anterior.

Tubo	Toxoide dializado	Mezcla buffer Mc Illvaine	H ₂ SO ₄ 2 ‰	pH	Rendimiento % Lf	N/Lf en gamas
1	toxoide P. . .	—	Hasta pH indicado	4,3	50	1,35
2		—		4,1	70	1,6
3		—		3,8	81	1,4
4	20 cc. en cada	—		3,4	81	1,4
5		4 cc.	—	4,3	50	1,6
6	tubo	4 »	—	4,1	75	1,42
7		4 »	—	3,8	85	1,56
8		4 »	—	3,4	85	1,52
9	toxoide M.	—	Hasta pH indicado	4,3	50	1,76
10		—		4,1	68	1,51
11		—		3,8	73	1,62
12	20 cc. en cada	—		3,4	73	1,42
13	tubo	4 cc.	—	4,3	60	1,70
14		4 »	—	4,1	70	1,45
15		4 »	—	3,8	78	1,43
16		4 »	—	3,4	78	1,35

Los toxoides obtenidos de medios simplificados que por la sola diálisis reducen el valor N/Lf de 58-54 para toxoide P. y 46,44 para toxoide M., a 5,3-3,6 y 4,1-3,8 gamas respectivamente, por una subsiguiente precipitación por ácido pasan a valores que oscilan entre 1,35 y 1,76 gamas. El rendimiento en por ciento de Lf es del mismo orden que en los toxoides no dializados. Cuando se flocula el toxoide dializado por acción de mezcla buffer, el rendimiento en Lf es superior en un 5 % al que se obtiene si la precipitación se realiza por adición directa de ácido.

B) RELACIÓN ENTRE LA DETOXIFICACIÓN POR EL FORMOL Y LA
RECUPERACIÓN POR PRECIPITACIÓN EN PUNTO ISOELÉCTRICO

Cuando se precipita la toxina de los medios de Pappenheimer o Mueller en su punto isoeléctrico (pH 4,1) por adición de ácido o mezcla buffer se obtiene un rendimiento en Lf que difícilmente pasa del 65 % y el producto así separado tiene una relación d. m. m./Lf que corresponde al 50 % de dicha relación en la toxina original. En cambio, esta misma toxina, detoxificada por formol al 2 ‰, permite en las mismas condiciones, un rendimiento en Lf que llega al 85 % sin que se observen alteraciones apreciables en las cualidades del antígeno.

Hemos estudiado la variación de la sensibilidad de la toxina al ion H. durante el proceso de la detoxificación por el formol.

Para ello, hemos partido de una toxina P. sometida a precipitaciones por ácido sulfúrico al 2 % en pH 3,8, empleándola tanto en su constitución original como también durante el proceso de su detoxificación por el formol. Inicialmente las características de la toxina fueron: $38 \text{ Lf} \times \text{cm}^3$; $2.857 \text{ d. m. m.} \times \text{cm}^3$ y un valor de $\text{d. m. m./Lf} = 75$.

Modus operandi: A 200 c. c. de toxina o toxina más formol mantenida entre $0^\circ - 1^\circ\text{C}$ se agrega ácido sulfúrico al 2 % hasta pH 3,8. Después de dejar en reposo durante 15 minutos a la temperatura indicada, se centrifuga enérgicamente 15 minutos a la misma temperatura. Se decanta el líquido y el tubo con el precipitado se invierte sobre papel de filtro a fin de escurrir el líquido residual. El precipitado se redisuelve en 100 c. c. de una mezcla de cuatro partes de solución fisiológica y una de mezcla buffer de fosfatos a pH 7,6. En los líquidos obtenidos en cada uno de los tiempos de detoxificación estudiados se determina Lf y d. m. m. por centímetro cúbico. En la tabla VI se resumen los valores obtenidos.

Si consideramos las d. m. m. y Lf que se recuperan en los diferentes precipitados en pH 3,8 de las mezclas toxina + formol a tiempos diferentes, se observa que las dosis mínimas mortales representan en cada precipitado sólo el 30 % de su valor primitivo y el valor Lf pasa de 52 % en la toxina original a 65 % al cabo de una hora y a 81 % a las tres horas de acción del formol. Este valor no es superado aun cuando la relación d. m. m./Lf de las diferentes mezclas pasa de 21,8 a 0,012 (tabla VI). Ahora bien, como el rendimiento por ciento de Lf en los diferentes precipitados aumenta hasta un máximo a medida que la toxicidad disminuye y el de las d. m. m. se mantiene constante, la relación de dichos valores decrece.

TEBLA VI

Tubo	Toxina e.c.	Formol 3 ‰ tiempo de contacto	Temp. de contacto toxina- formol	Dmm cc	$\frac{\text{Dmm}}{\text{Li}}$		
						cc.	
1	200	—	0° C	2857	75	100	
2	200	1 h.	0° C	2360	62	100	
3	200	3 h.	0° C	830	21,8	100	
4	200	6 h.	0° C	384	10,1	100	
5	200	12 h.	35° C	111	2,9	100	
6	200	24 h.	35° C	58	1,52	100	
7	200	48 h.	35° C	6	0,16	100	
8	200	72 h.	35° C	0,55	0,012	100	

Recuperación					
volumen			%		
Lf cc.	dmm cc.	$\frac{d \text{ mm}}{\text{Lf}}$	Lf	d mm	$\frac{dmm}{\text{Lf}}$
40	1818	37	52	31	49
48	1320	27,5	65	28	44
62,5	500	8	81	30	37
58	230	3,9	78	30	26
62,5	—	—	81	—	—
58	—	—	78	—	—
58	—	—	78	—	—
62,5	—	—	81	—	—

El mismo experimento se ha realizado con toxina obtenida en medio de agua de carne y peptona y los resultados que se anotan en la tabla VII indican que la acción del formol en este caso es similar al observado en medio simplificado.

C) PURIFICACIÓN DEL TOXOIDE

Los toxoides P. y M. originales precipitados en su punto isoelectrico dan soluciones con un valor N/Lf de 2,0 a 1,6 gamas. Los mismos toxoides, dializados previamente a su precipitación en punto isoelectrico, tienen un valor N/Lf de 1,76 a 1,35 respectivamente. Pero si recordamos que la simple diálisis de dichos toxoides ya disminuye el valor N/Lf de 58, 54, 46 y 44 gamas a 5,3, 3,6, 4,1 y 3,8 (tabla IV) está claro que en realidad, la substancia activa del toxoide se separa en su punto isoelectrico sobre la tercera parte del nitrógeno no dializable. Si bien es evidente que con respecto al medio simplificado primitivo esta reducción significa una considerable purificación, ya no lo es tanto cuando se toma como valor límite para toxoide 0,46-0,55 gama N/Lf establecido para toxina.

Hemos ensayado si nuevas precipitaciones en punto isoelectrico son capaces de provocar un aumento de la concentración de la substancia activa por unidad de nitrógeno y si del toxoide semipurificado en punto isoelectrico se puede separar la proteína inactiva por acción del sulfato de amonio a 1/3 de saturación a fin de acercarnos al valor N/Lf señalado más arriba.

a) *Precipitaciones sucesivas en punto isoelectrico.* — La serie de precipitaciones han sido realizadas de acuerdo al *modus operandi* siguiente (tabla VIII):

- 1) 500 c. c. de toxoide P. de 30 Lf por c. c. y 58 gamas N/Lf, se tratan por ácido sulfúrico al 2 % hasta obtener pH 3,8. El precipitado obtenido por centrifugación se redisuelve en 110 c. c. de mezcla buffer-fisiológica a pH 7,6: *solución 1*); (110 Lf por c. c., 80 % de rendimiento y 2,1 gama N/Lf). Si esta solución se dializa durante 24 horas, el valor N/Lf pasa de 2,1 gama a 1,84.
- 2) 40 c. c. de solución 1 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 40 c. c. Se obtiene *solución 2*; (100 Lf por c. c., rendimiento 90 % y 1 gama N/Lf).
- 3) 30 c. c. de solución 2 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 30 c. c. *Solución 3*; (90 Lf por c. c., rendimiento 90 %, 0,92 gamas N/Lf).
- 4) 20 c. c. de solución 3 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 20 c. c. *Solución 4*; (90 Lf por c. c., rendimiento 100 %, 0,86 gamas N/Lf).

Tubo	Toxina cc.	Formol 6 ‰ tiempo de contacto	Temp. de contacto toxina- formol	L
1	960	—	0° C	
2	960	1 h.	0° C	
3	965	4,30 h.	0° C	
4	970	8 h.	35° C	
5	800	12 h.	35° C	
6	400	24 h.	35° C	
7	240	48 h.	35° C	
8	500	72 h.	35° C	

TABLA VII

f cc.	D m m cc.	$\frac{D m m}{L f}$	Recuperación						
			Volumen				%		
			cc.	Lf cc.	d m m cc.	$\frac{d m m}{L f}$	Lf	d m m	$\frac{d m m}{L f}$
14	1250	89	103	70	3300	47	52	28	53
14	1000	75	168	60	1666	27,6	75	29	40
14	333	23,8	140	90	708	7,8	90	30	32
14	166	11,7	106	100	—	—	80	—	—
14	70	5	93	110	—	—	90	—	—
14	25	1,7	33	150	—	—	89	—	—
14	2	0,14	35	80	—	—	84	—	—
14	0,7	0,05	31	150	—	—	83	—	—

b) *Precipitaciones sucesivas por sulfato de amonio a 1/3 de saturación:*

- 2') 50 c. c. de solución 1 se trata por sulfato de amonio hasta 1/3 de saturación (11,83 gramos); se deja en frío durante 24 horas; se separa el floculado que se forma. El líquido sobrenadante se dializa y se obtiene la *solución 2'*; (70 c. c., 65 Lf por c. c., rendimiento 80 %, 1 gama de N/Lf).
- 3') 40 c. c. de solución 2') se tratan en la forma indicada en 2'); se obtienen 52 c. c. de *solución 3'*; (40 Lf por c. c., rendimiento 82 %, 0,75 gamas N/Lf).
- 4') 40 c. c. de solución 3') se tratan como en 2'); se obtienen 50 c. c. de *solución 4'*; (28 Lf por c. c., rendimiento 82 %, 0,62 gamas N/Lf). Este líquido da aun opalescencia por nueva adición de sulfato de amonio a 1/3 de saturación, pero no hemos continuado la operación dado el escaso contenido en Lf por c. c.

Esta marcha también se realizó con toxoide M.

a) *Precipitaciones sucesivas en punto isoeléctrico:*

- 1) 500 c. c. de toxoide M. de 55 Lf por c. c. y 44 gamas N/Lf se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 200 c. c. *Solución 1* (105 Lf por c. c. —1,9 gamas N/Lf, rendimiento 76 %).
- 2) 90 c. c. de solución 1 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 80 c. c. dando lugar a la *solución 2*; (95 Lf por c. c., rendimiento 90 % y 0,98 gamas N/Lf).
- 3) 80 c. c. de solución 2 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 80 c. c.: *solución 3*; (90 Lf por c. c., 0,96 gamas N/Lf, rendimiento 95 %).
- 4) 50 c. c. de solución 3 se llevan a pH 3,8; el precipitado se redisuelve en 50 c. c.: *solución 4*; (90 Lf por c. c., 0,92 gamas N/Lf, rendimiento 100 %).

b) *Precipitaciones sucesivas por sulfato de amonio al 1/3 de saturación:*

- 2') 100 c. c. de solución 1 se tratan por 23,66 gramos de sulfato de amonio, después de 24 horas en cámara fría se centrifuga y el líquido sobrenadante se dializa. Se obtiene la *solución 2'*; (120 c. c., 95 Lf por c. c.; 1 gama N/Lf, rendimiento 87 %).
- 3') 100 c. c. de solución 2', nueva precipitación con sulfato de amonio al 1/3 de saturación y el líquido sobrenadante dializado constituye *solución 3'*; (120 c. c., 65 Lf por c. c., 0,74 gamas N/Lf, rendimiento 82 %).
- 4') 100 c. c. de solución 3', por subsiguiente precipitación por sulfato de amonio al 1/3 de saturación da lugar a la *solución 4'*; (110 c. c., 45 Lf por c. c., 0,56 gamas N/Lf, rendimiento 75 %).

Como puede verse en la tabla VIII, en la segunda precipitación en punto isoeléctrico el principio activo del toxoide se separa sobre un substratum nitrogenado que equivale a la mitad del valor dado

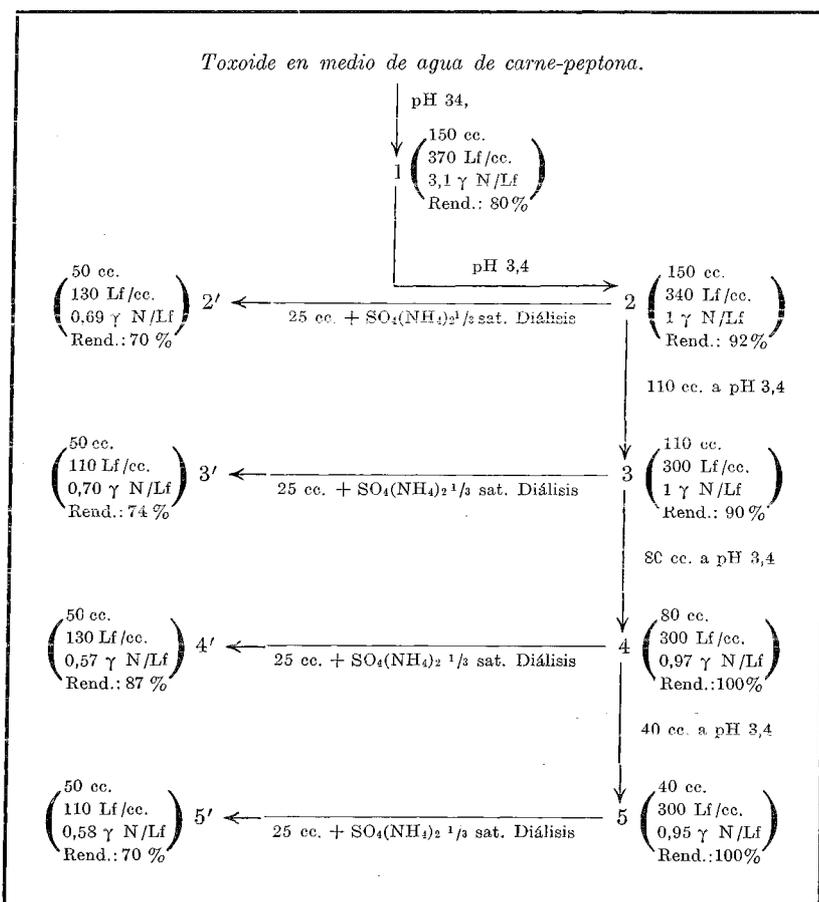
TABLA VIII. — *Precipitaciones sucesivas por ácido y sulfato de amonio de los toxoides P. y M.*

Toxoides P (formol 3 ^o /100)		Toxoides M (formol 2 ^o /100)	
500 c.c.		500 c.c.	
(30 Lf/cc. 58 γ N/Lf)		(55 Lf/cc. 44 γ N/Lf)	
pH 3,8		pH 3,8	
↓		↓	
(110 cc. 110 Lf/cc. 2,1 γ N/Lf Rend.: 80%)		(200 cc. 105 Lf/cc. 1,9 γ N/Lf Rend.: 76%)	
1		1	
40 cc. pH 3,8	50 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 2 1/3 sat.	90 cc. a pH 3,8	100 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 1 1/3 sat.
↓	↓	↓	↓
2 (40 cc. 100 Lf/cc. 1 γ N/Lf Rend.: 90%)	2' (70 cc. 65 Lf/cc. 1 γ N/Lf Rend.: 80%)	2 (90 cc. 95 Lf/cc. 0,98 γ N/Lf Rend.: 90%)	2' (120 cc. 95 Lf/cc. 1 γ N/Lf Rend.: 87%)
30 cc. pH 3,8	40 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 1/3 sat.	80 cc. a pH 3,8	100 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 1/3 sat.
↓	↓	↓	↓
3 (30 cc. 90 Lf/cc. 0,92 γ N/Lf Rend.: 90%)	3' (52 cc. 40 Lf/cc. 0,75 γ N/Lf Rend.: 82%)	3 (80 cc. 90 Lf/cc. 0,96 γ N/Lf Rend.: 95%)	3' (120 cc. 65 Lf/cc. 0,74 γ N/Lf Rend.: 82%)
30 cc. pH 3,8	40 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 1/3 sat.	50 cc. pH 3,8	100 cc. + SO ₄ (NH ₄) ₂ 1/3 sat.
↓	↓	↓	↓
4 (20 cc. 90 Lf/cc. 0,86 γ N/Lf Rend.: 100%)	4' (50 cc. 28 Lf/cc. 0,62 γ N/Lf Rend.: 82%)	4 (50 cc. 90 Lf/cc. 0,92 γ N/Lf Rend.: 100%)	4' (110 cc. 45 Lf/cc. 0,56 γ N/Lf Rend.: 75%)

por la primera precipitación, pasando de 1,9 y 2,1 (para toxoides P. y M.) a 0,98 gamas N/Lf con una recuperación de 80 a 90 %. En las subsiguientes precipitaciones en P. I. esta purificación no progresa. En cambio, si a la solución de toxoide obtenida después

TABLA IX

Acción de precipitaciones sucesivas por ácido y sulfato de amonio a 1/3 de saturación sobre un toxoide previamente separado de un medio de agua de carne peptona por agregado de ácido sulfúrico en pH 3,4.



de cuatro precipitaciones en P. I. se la trata por sulfato de amonio al 1/3 de saturación, se consigue un valor N/Lf de 0,58 gamas con una pérdida adicional de 24 %.

Pero si al toxoide separado del medio original por una precipitación en P. I. se lo trata por sulfato de amonio al 1/3 de satu-

ración y se repite esta última operación en tanto aparece un precipitado, se pasa de 1,9 gamas de N/Lf a 1,—, 0,74 y 0,56 sucesivamente, con pérdidas que van del 13 al 25 % en cada operación.

Aplicado este procedimiento a la purificación de un toxoide previamente separado de un medio agua de carne-peptona por acción del ácido sulfúrico, se obtienen resultados similares a los indicados más arriba para toxoides separados de medios simplificados (tabla IX).

Como se ha observado para toxoides provenientes de medios simplificados también el toxoide elaborado en medio agua de carne-peptona separado a pH 3,4, reduce el valor N/Lf en la segunda precipitación, pasando de 3,1 a 1 gama con un 20 % de pérdida. Nuevas precipitaciones a pH 3,4 no disminuyen el valor N/Lf. En cambio si cada una de las fracciones obtenidas por precipitación en medio ácido se tratan por sulfato de amonio a 1/3 de saturación, el valor N/Lf pasa de 1 a 0,58 gamas.

Ahora bien, cuando se trata un toxoide previamente separado a pH 3,4 de medio agua de carne-peptona por precipitaciones repetidas con sulfato de amonio al 1/3 de saturación, se obtiene después de cuatro precipitaciones un valor de N/Lf de 0,62 gamas, con una pérdida que oscila entre 13 y 24 % en cada operación.

Valor antigénico de los toxoides estudiados. — Hemos examinado la capacidad de estimular la producción de antitoxina de los toxoides siguientes: 1) solución original de los toxoides elaborados en medios simplificados, 2) los mismos precipitados en su P. I. una y dos veces, 3) precipitación en P. I. y fraccionamiento por sulfato de amonio, 4) solución original de toxoide obtenido en medio agua de carne-peptona, 5) del mismo separado a pH 3,4, una y dos veces.

Para ello se inmunizaron con cada antígeno por vía subcutánea lotes de 10 cavia de 250 gramos, inoculándose dos dosis de 5 Lf a 20 días de intervalo. La medición realizada en conejo por vía intradérmica demostró que el valor antigénico de los toxoides obtenidos por los procedimientos enunciados es prácticamente el mismo, oscilando los valores para la sangría exploratriz realizada previamente al segundo estímulo entre 1/100 y 1/30 de unidad anti-tóxica y para la sangría exploratriz efectuada 20 días después del segundo estímulo entre 1/10 y 2 unidades antitóxicas.

CONCLUSIONES

El toxoide diftérico elaborado en medio simplificado flocula en presencia de electrolitos por acción de ion hidrógeno en una zona comprendida entre pH 4,6 y pH 3,0.

El máximo rendimiento en Lf se halla en pH 3,8. Un aumento de concentración de ion hidrógeno no mejora el rendimiento.

Por simple diálisis, el valor N/Lf de estos toxoides pasa de 54 a 3,6 gamas.

Por precipitación directa en punto isoeléctrico el toxoide de medio simplificado se separa sobre la tercera parte del nitrógeno no dializable, dando un valor N/Lf de 1,5 gamas.

Sucesivas precipitaciones en P. I. reducen dicho valor hasta 1 gama.

Por precipitación en P. I. y subsiguiente tratamiento con sulfato de amonio a 1/3 de saturación se obtiene un valor N/Lf de 0,56 de gama con un 50 % de rendimiento.

La capacidad vacunante del antígeno así obtenido es prácticamente igual a la del toxoide primitivo.

BIBLIOGRAFIA

1. PAPPENHEIMER, A. M.: *J. Biol. Chem.* **129**: 543-553, 1937.
2. EATON, M. D.: *The Journal of Bacteriology.* **31**: 347-366, 1936.
3. PAPPENHEIMER, A. M. and JOHSON, S. J.: *British Jour. Exper. Pathol.* **17**: 335-341, 1936.
4. MUELLER, J. H.: *Jour. Immunology.* **40**: 21-32, 1941.