

Purificación del suero anticarbuncloso

Por Fernando Modern y Raúl Wernicke

II

En un trabajo anterior hemos informado sobre los ensayos que realizamos por distintos métodos, a fin de obtener una purificación del suero anticarbuncloso.

Llegamos a la conclusión de que la simple dilución con agua sustituía eficazmente a la dilución con agua saturada de CO₂ (Sordelli) para precipitar cuantitativamente las proteínas activas (anticuerpos) y además, que bastaba la dilución al 1/5 para lograr este resultado en vez de al 1/10, ensayado anteriormente. Por otra parte, la electrodiálisis nos permitió precipitar cuantitativamente la parte activa (precipitinas y sustancias protectoras contra gérmenes vivos) si bien ligadas a una cantidad mayor de proteínas que en los ensayos por simple dilución. Agregaremos que en estos últimos sólo medíamos las precipitinas contenidas en las fracciones obtenidas por tratamiento del suero, suponiendo que los demás anticuerpos acompañarían siempre a las precipitinas.

Posteriores experimentos, de lo que damos ahora cuenta, han permitido confirmar nuestros resultados anteriores, pero no nuestra suposición, pues hemos observado una disociación, una separación de los agentes precipitante y protector contra la infección.

En estos ensayos, al proseguir el estudio de un método que nos permitiera obtener la separación de la totalidad o mayor parte de los anticuerpos fijada en la mínima cantidad de proteínas, hemos tratado además de verificar si existía la supuesta asociación o unidad de las sustancias precipitante (precipitinas) y protectora contra la infección.

Hemos empleado el método preconizado por Felton para la purificación del suero antineumocócico, a fin de establecer si

era aplicable al anticarbuncloso, y hemos ensayado la precipitación fraccionada por distintas diluciones del suero con agua sin adición de CO_2 .

Como más adelante se verá, nos ha sido posible por un método muy simple, obtener una purificación notable del suero, concentrando todo su poder protector contra la infección, en un líquido diáfano, incoloro, cuyo contenido en proteínas era 20 veces menor que el del suero original.

ENSAYOS CON EL MÉTODO DE FELTON

Felton ⁽¹⁾ ha encontrado un método para purificar suero antineumocócico basado en el fraccionamiento de las proteínas, obtenido por dilución del suero originario, y sus solubilidades en medios de determinados pH.

Siguiendo al pie de la letra este método, procedimos en la siguiente forma: 60 cm^3 de suero anticarbuncloso (851) son adicionados de 720 cm^3 de agua acidulada, obtenida agregando 1.3 cm^3 $\text{NO}_3\text{H N/1}$ a 1.200 cm^3 de agua. En esta dilución al 1/13 del suero se formó un precipitado, que separamos fácilmente por centrifugación y redisolvimos luego en 12 cm^3 de una solución $\text{NO}_3\text{Na N/20}$. En realidad obtuvimos una suspensión del precipitado, o una redisolución parcial, pues el líquido resultante era muy turbio y heterogéneo ⁽²⁾. Agregamos a éste $\text{NO}_3\text{H N/20}$ hasta que su pH estuviera comprendido entre los valores 4.6 y 4.8. Queda así una parte insoluble (fracción A) que separamos por centrifugación y redisolvemos en 30 cm^3 de solución de ClNa 2 \% obteniendo un líquido homogéneo pero muy opalescente.

El líquido sobrenadante de la separación por centrifugación de la fracción (A) es llevado a pH 6.6 agregándole NaOH N/20 y se diluye luego con 5 veces su volumen de H_2O . El precipitado que se forma es separado al día siguiente por centrifugación (fracción B) y redisolto en 30 cm^3 de solución ClNa 2 \% , proporcionando un líquido perfectamente claro.

Quedan así fraccionadas las proteínas en cuatro líquidos:

1) líquido sobrenadante obtenido al separar por centrifugación el

(1) *The Journ. of. Inf. Dis.* Vol. 42, pág. 259. 1928.

(2) Queda insoluble algo menos del 10 % de las proteínas precipitadas.

precipitado formado por dilución 1/13 del suero original; 2) solución de la fracción (A); 3) solución de la fracción (B); 4) líquido sobrenadante de la separación por centrifugación de la fracción (B). Según Felton la parte activa debe estar en la fracción (B), es decir, en el tercer líquido.

Medimos el contenido de precipitinas de los líquidos 2) y 3) y del líquido 1) operando para éste sobre 13 cm.³ llevados a sequedad en el vacío a 40°C y redisolviendo el residuo en 1 cm.³ de suero normal.

Distribución de las precipitinas del suero anticarbuncloso 851 en las fracciones de proteínas obtenidas por el método Felton.

Líquido	Concentración referida al Suero inicial	Proteína %	Reacción de precipitinas (Diluciones referidas al suero inicial)					
			1/10	1/20	1/30	1/50	1/60	1/80
Suero 851	1:1	7.7	++++	+++	+++	++	+	-
1)	1:1	6.9 (1)	++	-	-	-	-	-
2)	2:1	-	++	-	-	-	-	-
3)	2:1	-	+++	++	+	-	-	-

(1) Esta proporción corresponde a las proteínas provenientes del suero 851 sin tener en cuenta las del suero normal usado como disolvente.

Como se ve, los líquidos 1) y 2) contienen precipitinas y el líquido 3) solo tiene el 50 % de las precipitinas del suero inicial. Dado lo poco satisfactorio de este fraccionamiento hicimos un nuevo ensayo, variando el pH del líquido con que se extrae el primer precipitado.

En vez de limitarnos a usar un líquido de pH 4.6 - 4.8 como en el experimento anterior y de acuerdo a las indicaciones de Felton, ensayamos líquidos de distintos pH comprendidos entre 2.5 y 6.0.

Procedimos así: seis fracciones de 50 cm.³ de suero anticarbuncloso (935) fueron diluídas 1/13, agregándoles a cada uno de ellos 600 cm.³ de H₂O y 0.65 cm.³ de NO₃H N/1. Los seis líquidos fueron centrifugados y los precipitados fueron suspendidos y agitados cada uno en 10 cm.³ de solución buffer (según Mc. Ilvain) de pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 y 6.0.

Después de un contacto de más de 1 hora separamos la parte insoluble por centrifugación y reservamos las soluciones so-

brenadantes, en las que determinamos la proporción de proteínas disueltas y actividad precipitante (precipitinas).

pH del disolvente.	pH de la solución.	Proteína %	Reacción de precipitinas		
			1/20	1/60	1/100
2.5	—	—	—	—	—
3.0	—	—	—	—	—
3.5	4.1	—	+	—	—
4.0	4.35	3.67	+++	++	+
5.0	5.38	3.84	+++	++	+
6.0	6.16	3.84	+++	++	+

El suero 935 daba reacción de precipitinas hasta en diluciones 1/20, de modo que en este ensayo hemos recuperado totalmente las precipitinas en los tres últimos líquidos. Es muy probable que haya influido en este resultado la sal (citrato) contenida en el disolvente del precipitado.

Estos experimentos, como algunos otros, no han podido ser llevados más adelante por falta de material (suero anticarbuncloso), pero de todos modos nos han permitido establecer que el método Felton no es aplicable tal cual para el suero anticarbuncloso, pues conduce a una dispersión de las precipitinas en las distintas fracciones, lo que es probable suceda también con la sustancia protectora de la infección. Como creemos haber encontrado un método más sencillo de purificar estos sueros, no nos empeñamos, por la causa señalada, en tratar de aclarar estos puntos que quedan en suspenso.

ENSAYO DE PURIFICACIÓN DEL SUERO ANTICARBUNCLOSO POR DILUCIONES FRACCIONADAS CON AGUA DESTILADA

Por ensayos anteriores comprobamos que diluyendo al 1/5 con agua destilada el suero anticarbuncloso, precipitaban totalmente las precipitinas, en una fracción proteica que era soluble en solución C1Na al 2 %.

Como en aquellos experimentos nos limitamos a determinar el contenido de precipitinas de las fracciones obtenidas, nos propusimos dilucidar si corría igual suerte la substancia protectora contra la infección.

Dos porciones de 10 cm.³ de suero anticarbuncloso (935) fueron diluidos respectivamente al 1/5 y al 1/10 con H₂O, los líquidos decantados y centrifugados y cada precipitado disuelto en 10 cm.³ de solución ClNa al 2 %. 10 cm.³ del líquido sobrenadante de la precipitación al 1/10 (tenía un pH=8.08) y 5 cm.³ del líquido sobrenadante de la precipitación al 1/5 (tenía un pH=8,25), fueron llevados a sequedad en el vacío, en presencia de SO₄H₂. Ambos residuos, correspondientes a 1 cm.³ del suero inicial, fueron disueltos en 1 cm.³ de suero normal, comprobando que ninguno de los dos daban reacción de precipitinas. Efectivamente, tanto por dilución al 1/5 como al 1/10 con agua destilada teníamos una separación total de las precipitinas. Por otra parte las soluciones de los precipitados obtenidos en ambos casos daban reacción de precipitinas con igual intensidad (dilución 1/20) que el suero original.

En cambio el poder protector contra la infección lo poseía íntegramente la solución del precipitado obtenido por dilución al 1/10 del suero, lo que no sucedía con la solución del precipitado obtenido por dilución al 1/5, que sólo contenía la quinta parte del poder protector del suero inicial.

En un ensayo de precipitación por dilución al 1/5 con agua destilada, en que disolvimos el precipitado en un volumen de solución de ClNa al 2 % que era la quinta parte del volumen inicial del suero empleado, obtuvimos los resultados que a continuación anotamos, a la par de los que proporciona el suero inicial.

Líquido	Proteína %	Concentración con respecto al suero	Poder protector contra infección	Reacción de precipitinas				
				1/10	1/20	1/50	1/80	1/100
Suero 935	7.7	1:1	5 cm. ³	++	+	-	-	-
Solución ppdo. al 1/5.....	1.8	5:1	5 cm. ³	+++	+++	++	+	-

Por disolución en menor volumen (1/5) del precipitado obtenido por dilución al 1/5 con H₂O del suero anticarbuncloso se

consigue una concentración efectiva de las precipitinas, pero no de la acción protectora. Es de señalar, sin embargo, que el líquido obtenido tiene igual poder protector que el suero inicial a pesar de que su contenido en proteínas es 4.3 veces menor.

Pero la pérdida del poder protector es muy grande (80 %) así que el método no es prácticamente utilizable.

Con estos antecedentes ideamos el siguiente método: Diluir primeramente el suero al 1/3 con H₂O, condiciones en las cuales no precipitaría la substancia protectora contra la infección, o lo haría en mínimas proporciones y luego diluir al líquido sobrenadante hasta decuplicar el volumen inicial del suero, y como por dilución al 1/10 precipita totalmente la substancia protectora, obtendríamos un segundo precipitado con la totalidad o casi totalidad de la parte activa, ligada a una pequeña proporción de proteína.

A 25 cm.³ de suero anticarbuncloso 851 le agregamos 50 cm.³ de agua (dilución 1/3). A las 48 horas separamos el precipitado formado, por centrifugación y lo redisolvimos en 25 cm.³ de solución de ClNa al 2 %, obteniendo un líquido bastante opalescente. Esta fracción, de acuerdo con nuestras previsiones, debía ser inactiva.

Al líquido sobrenadante del precipitado obtenido por dilución al 1/3 (75 cm.³) lo llevamos a 250 cm.³ (dilución al 1/10) por adición de H₂O. El precipitado separado por centrifugación lo redisolvimos en 25 cm.³ de solución de ClNa al 2 %, obteniendo un líquido apenas opalescente por reflexión, que debía contener una gran proporción o la totalidad de la substancia protectora contra la infección.

El suero 851 era capaz de proteger a los conejos contra la infección de gérmenes anticarbunclosos (20 dosis mínimas mortales) inyectado en la cantidad de 4 cm.³. La disolución del precipitado obtenido por dilución al 1/3 requería 10 cm.³ para obtener el mismo efecto y en cambio la solución del precipitado obtenido extendiendo la dilución hasta el 1/10 protegía con 4 cm.³, es decir, con igual volumen que el suero original.

Repetimos el experimento, pero redisolviendo los precipitados en un volumen de líquido 5 veces menor que el volumen inicial del suero, con lo que lo concentrábamos 5 veces.

120 cm.³ de suero anticarbuncloso 851 fueron diluidos al 1/3 con agua destilada y el precipitado que se forma, separado por centrifugación y redisolto en 24 cm.³ de solución de ClNa al

2 %. Al líquido sobrenadante de la primera precipitación se lo diluye con H₂O hasta decuplicar el volumen inicial del suero y el precipitado que se forma es también redisueltó en 24 cm.³ de solución de CINA' al 2 %. La solución del precipitado que se separa diluyendo al 1/3 es muy opalescente y en cambio obtenemos por redilución de lo que precipita diluyendo el suero al 1/10 un líquido perfectamente claro.

El cuadro siguiente contiene los resultados de este experimento:

Líquido	Concentración referida al suero.	Proteínas %	Acción protectora	Observaciones
Suero 851.....	1:1	7.70	4 cm. ³	---
Solución del ppdo. por dilución al 1/3	5:1	1.2	3 cm. ³	Líquido opalescente
Solución del ppdo. por dilución al 1/10	5:1	2.04	0.8 cm. ³	Líquido límpido

El protocolo de las medidas del poder protector contra la infección es el siguiente:

Conejo	Líquido	Volumen inyect.	Resultado a los días					
			1	2	3	4	5	6
1	Solución ppdo. al 1/3	1.5 cm. ³	—	ed	ed	ed	+	
2	»	1.5 »	—	ed	ed	ed	+	
3	»	2.0 »	—	ed	ed	ed	+	
4	»	2.0 »	—	ed	ed	ed	+	
5	»	3.0 »	—	—	—	—	—	—
6	»	3.0 »	—	—	—	—	—	—
7	Solución ppdo. al 1/10	0.8 »	—	—	—	—	—	—
8	»	0.8 »	—	—	—	—	—	—
9	»	1.2 »	—	—	—	—	+	—
10	»	1.2 »	—	—	—	—	—	—
11	»	1.8 »	—	—	—	—	—	—
12	»	1.8 »	—	—	—	—	—	—
13	—	Control	ed	ed	ed	ed	ed	ed
14	—	»	ed	+				

En este experimento si bien uno de los animales testigos sobrevivió a la infección aunque con edema, no deja de verse que el método ensayado permite una gran concentración del suero anticarbuncloso (5 veces) sin pérdidas sensibles de sustancia protectora, proporcionando un líquido muy pobre en proteínas, pues quintuplicando la acción protectora contra la infección del suero obtenido contiene 26.5 % de las proteínas del suero originario. Hemos concentrado casi 20 veces su actividad.

Finalmente sometimos a este mismo tratamiento a un suero anticarbuncloso poco activo, pues procedía de un caballo muy utilizado, que por lo general proporciona sueros de poco valor. Se trata de un suero (538) que daba la reacción de precipitinas hasta en diluciones de solo 1/20 y que requería 6 cm.³ para manifestar la propiedad protectora contra la infección. Solo lo concentramos a la mitad, pues redisolvímos los precipitados en un volumen de solución ClNa al 2 %, mitad del suero empleado.

Determinamos precipitinas en la fracción proteica obtenida por dilución al 1/10 y en las obtenidas por dilución al 1/3 y subsiguiente al 1/10. En las dos fracciones obtenidas por dilución al 1/10, directamente y con dilución previa al 1/3, determinamos el poder protector contra la infección. Los resultados de estos experimentos están consignados en los siguientes protocolos:

Líquido	Concentración referida al suero inicial	Proteína %	Reacción Precipitinas		Poder protector
			1/10	1/20 (1)	
Suero 538.....	1:1	8.05	+++	++	6 cm. ³
Soluc. del ppdo. por dilución 1 10 (2)	2:1	3.25	+++	++	3 »
Soluc. del ppdo. por dilución 1 3	2:1	1.82	+	—	—
Soluc. del ppdo. por dilución 1 10	2:1	1.50	++	+	3 »

(1) Diluciones referidas a la concentración inicial del suero 538.

(2) Sin precipitación previa por dilución al 1|3.

Estos experimentos nos han permitido duplicar el poder protector del suero disminuyendo sus proteínas a menos del 20 por ciento del contenido original.

La separación de la fracción que precipita por dilución al $1/3$ no provoca una pérdida sensible de los anticuerpos y en cambio reduce a menos de la mitad la proporción de proteínas y además permite obtener líquidos muy diáfanos en oposición a los opalescentes que se obtienen utilizando todo el precipitado que proporciona la dilución directa al $1/10$.

La prosecución de estas investigaciones no será posible hasta dentro de unos meses, en que dispondremos de material (suero anticarbuncloso) y a esta razón obedece que no hayamos podido repetir nuestros ensayos para aclarar algunos puntos y completar otros que son de interés teórico y práctico.

Antes de terminar debemos agradecer a los doctores P. Beltrami y C. M. Harispe, las medidas de poder protector por ellos efectuadas, que figuran en este trabajo.

CONCLUSIONES

1º Hemos comprobado que el método preconizado por Felto para purificar y concentrar el suero antineumocócico no es aplicable, con los mismos fines, al suero anticarbuncloso.

2º Por dilución al $1/5$ del suero anticarbuncloso con agua destilada se obtiene un precipitado que contiene la totalidad de las precipitinas, pero sólo una pequeña parte de las substancias protectoras contra la infección.

3º Por diluciones sucesivas al $1/3$ y al $1/10$ del suero anticarbuncloso con agua destilada, se obtiene un precipitado perfectamente soluble en solución de ClNa al 2 %, que encierra la totalidad del poder protector del suero inicial en una cantidad 20 veces menor de proteínas.