FLOCULACION DE TOXOIDES TETANICOS Y SU APLICACION EN LA MEDICION DE SANGRIAS EXPLORADORAS

Por FERNANDO MODERN, GUILLERMO RUFF y ALEJANDRO GATTI

Ya en el año 1926 Ramón y Descombey (1) describen por primera vez el fenómeno de floculación entre la toxina tetánica y el suero antitóxico, pero encuentran también floculaciones anormales que no corresponden al punto de neutralización entre la toxina-antitoxina. Todo ello posteriormente es comprobado por Abt y Erber (1926) (2), por Kalic (1928) (3), por Schmidt (1927-1928) (4) y por Darzine (1929) (5). Este último autor encuentra sólo una concordancia del 47 % entre los métodos "in vivo" e "in vitro".

En el año 1937 Ramón (6) anuncia que, por un método especial de hiperinmunización, consigue sueros de caballos con una zona específica simple de floculación para la toxina. Este método consistía en usar toxinas provenientes de cultivos jóvenes de bacilos tetánicos conteniendo mínimas cantidades de proteínas no específicas. Los caballos previamente vacunados sufrían una rápida hiperinmunización con toxoide, al que agregaba tapioca o lanolina.

Esta antitoxina "standard" la usaba Ramón para valorar "in vitro" el toxoide tetánico.

Estudiando las falsas zonas de floculación, Prevost (7) propone un método gráfico para delimitar la zona verdadera de la falsa.

Prevot sostiene que la floculación verdadera entre la toxina y antitoxina tetánica se representa gráficamente por una curva muy regular del tipo de una hipérbole equilátera. Es la misma curva que representa la floculación de mezclas de toxina y antitoxina diftérica, por lo que sostie-

Presentado para publicar el 11 de octubre de 1949.

ne que se trata de un fenómeno general. La floculación anormal (paradojal) se inscribe sobre el mismo gráfico, por una curva netamente diferente de la primera, y los dos fenómenos se diferencian analizando la curva.

Abt y Erber (loc. cit.) encuentran substancias de naturaleza coloidal, que inhiben la floculación o la retardan, y sueros que llaman recalcitrantes, que no consiguen hacer flocular.

Otros autores, Kalic y Abt y Erber (loc. cit.), encuentran que este método de floculación es bueno para algunos sueros, pero para otros no. En 53 sueros analiza dos zonas de floculación.

Recién en el año 1937 Ramón y Descombey (loc. cit.) dan la técnica para medir por floculación el valor antigénico de la toxina y antitoxina tetánica. Fijan el método de valoración e indican cómo se puede calcular el valor antigénico de una toxina y de una anatoxina tetánica en unidades antigénicas o anatóxicas.

Recientemente Müeller y Miller (8) describen una variante de la cepa Cl. tetani, que produce un alto valor de toxina usando un medio de cultivo especial, y esta toxina flocula con la antitoxina en su punto neutro. Más adelante, estos mismos autores establecen la relación entre los Lf, Lo y Kf, en toxinas tetánicas viejas y nuevas. No encuentran relación entre Lf y Kf, y concluyen esta parte del trabajo diciendo: "En ciertas mezclas de toxina y antitoxina se produce la floculación como la refiere Ramón." "Esta floculación no aparece regularmente y no es siempre una indicación del punto neutro de la mezcla de toxina y antitoxina, como en el caso de la difteria." Aconsejan acompañar los ensayos de floculación con la inyección en animales de la mezcla floculante. Agregan que ciertos sueros y toxinas presentan varias zonas de floculación y que sólo en algunos casos se puede aplicar este procedimiento.

Müeller y Miller (loc. cit.), estudiando las dificultades que observan en las mediciones por floculación, consiguen demostrar que las toxinas de poco valor dan dos zonas de floculación no específicas. En cambio, las toxinas de 60 Lf (600 D. T.) floculan rápidamente en menos de 20 minutos. Consiguen también medir en esta forma los toxoides que se encuentran en el comercio y con menor valor, pero muy purificados, y que contienen entre 3,5 y 15 Lf, y que representan una toxina inicial de 35 a 150 D. T.

Goldie, Parsons y Bower (9) para conseguir una toxina "standard" usan un suero purificado por el método de Parfentjev, que da un punto específico de floculación. La antitoxina de este suero corresponde a una globulina que ha sido modificada por una digestión pépsica. Estos autores consideran que los Lf de las toxinas son una expresión de su antigenicidad. La conversión de la toxina en toxoide por el formol está asociada a una disminución del 10 % de los Lf primitivos.

Como estábamos interesados en medir por floculación nuestros toxoides y las sangrías exploradoras de los caballos inmunizados con tétano, comenzamos por preparar nuestro suero "standard" partiendo de un suero purificado por digestión pépsica. Este suero fué medido en animales y se llevó a la concentración de 100 u. americanas por ml. Sin embargo, con este suero no era posible hacer flocular nuestros toxoides nativos. Era necesario purificarlos y concentrarlos, y sólo así conseguíamos en todos los casos toxoides medibles por floculación y que no daban zonas que no correspondiesen al punto de neutralización del toxoide-antitoxina.

Método de obtención de los toxoides purificados

En un trabajo ya publicado (10) uno de nosotros, en colaboración con Sordelli y Ferrari, concentró el toxoide tetánico. Era necesario, sin embargo, dializar el toxoide antes de acidificado para evitar una pérdida que en muchos casos llegaba al 70 % del valor inicial. A continuación damos el método que usamos ahora para concentrar y purificar el toxoide, sin pérdidas en sus Lf y sin utilizar la diálisis, que resulta engorrosa para grandes cantidades de toxoides.

Sobre una parte alicuota del toxoide a precipitar se determina exactamente la cantidad de H_2SO_4 5N para llevarlo a pH 4. 9.

Al toxoide enfriado a 0ºC se le agrega la mitad del alcohol correspondiente (20 % en volumen), que fué previamente enfriado a -10ºC. Se mezcla bien y se deja en cámara fría durante la noche a -10-12ºC. Trabajando en estas condiciones el toxoide-alcohol se enfría a -10ºC sin congelación. Se le agrega la cantidad de ácido previamente calculado más un 5 % e inmediatamente la otra mitad del alcohol (-10ºC), dejando esta mezcla otras 24 horas

en cámara fría. En esta forma la temperatura final no es mayor de -7ºC y no se obtienen pérdidas en las Lf presentes; los flóculos son gruesos y la filtración es relativamente rápida. La filtración se realiza en cámara fría. Deberá eliminarse lo mejor posible el alcohol, dejando escurrir bien los papeles. El precipitado se disuelve en agua a pH 7.2, llevándolo a la décima parte del volumen original. Una segunda precipitación se hace exactamente en la forma descripta anteriormente, pero su volumen final es 25 veces inferior al volumen inicial.

Si bien la purificación obtenida no es tan grande como la descripta en nuestro primer trabajo (11), los toxoides son de rápida floculación.

Empleando este método de precipitación por alcohol etílico no se observan pérdidas. Para demostrarlo, ya que no se puede medir directamente el toxoide nativo por la presencia de substancias inhibidoras y su bajo valor, hicimos el siguiente ensayo: 3 litros de toxoide original se dializa durante 72 horas en cámara fría. Las últimas 24 horas, en presencia de agua destilada. Se lleva a pH 6.5, se agrega una gota de aceite de castor para evitar la espuma y se concentra al vacío, a 45ºC, hasta 325 ml. Corresponde a una concentración final de 9,25 veces y flocula rápidamente, dando 222 D. T. Este valor corresponde a 24 D. T. para el toxoide original. Como encontramos alrededor de 250 D. T. en el toxoide concentrado 10 veces, y considerando el error del método, podemos afirmar que, por la concentración con alcohol etílico, no se produjeron pérdidas aparentes. A continuación damos los valores que hemos obtenido en uno de los ensayos. El toxoide original contiene alrededor de 3,53 mg de N por ml. Como cada ml contiene de 24 a 25 D. T., podemos decir que el valor original es de 0,14 mg de N por D. T. Después de la primera precipitación encontramos alrededor de 3,50 γ de N por dosis test, y corresponde a una purificación de 40 veces con respecto al toxoide nativo (0,14/0,0035). Después de la segunda precipitación el valor obtenido es de 1,0 γ de N por D. T. y da una purificación de 140 veces (0,14/0,001) con respecto al valor inicial. Estos toxoides contienen 100 Lf por mg de N.

Como sólo la purificación no permitía obtener la floculación rápidamente, concentramos nuestros toxoides de 25 a 50 veces. Preparamos así toxoides que floculaban rápi-

damente en poco tiempo. Por ejemplo: un toxoide que purificado y concentrado contenía 625 D. T., daba un tiempo de floculación de 25 minutos.

Otro toxoide de 715 D. T. daba un tiempo de floculación de 20 minutos. Un toxoide concentrado 10 veces daba 333 D. T./ml y tardaba 60 minutos en flocular. Si el mismo toxoide se volvía a precipitar y se concentraba 25 veces, floculaba en 20 minutos y contenía 715 D. T./ml. Es decir que aumentando la purificación hasta cierto límite y la concentración conseguimos toxoides de rápida floculación.

Con toxoides de este tipo es posible hacer la floculación de los sueros de caballos inmunizados con tétano. Usamos por tubo 100 Lf de toxoide purificado. Muchos sueros floculaban ya a los 30 minutos. Más del 80 % floculaban antes de las 3 horas.

Calentábamos los tubos en baño María a 48ºC y en todos los casos se tomó el tiempo de floculación (Kf).

Como eran ensayos para separar los caballos que dieran buen valor, se midió en cada caso 1.000, 1.500, 2.000 y 3.000 u. americanas.

Todos los sueros, además, se midieron "in vivo" en cobayos aplicando el método clásico de Ehrlich. El toxoide contenía 1/5.000 de mertiolato a pH 7.2 y fué medido con un suero "standard". Sólo observamos siempre una zona de floculación; en ningún caso encontramos dos zonas.

Preparación del suero "standard"

Se usó un suero antitetánico purificado por proteolisis pépsica, que contenía 2.200 u. americanas por ml.; 45,5 cm³ de este suero (100.000 u. americanas) se llevaron con solución fisiológica a 1.000 cm³. Esta solución contenía 5 ‰ de mertiolato. En esta forma se preparó un suero patrón que contenía 100 u. americanas o 100 Lf (1.000 D. T.) por ml. Luego se volvió a medir el suero usando toxina patrón y 3 animales por medición.

En el cuadro que va a continuación damos los valores obtenidos "in vivo" e "in vitro" correspondientes a 54 caballos de sangrías exploradoras al término de la inmunización.

Caballo Nº	Valor Vivo	Valor Vitro	Kf
121	1400	1400	180
123	1300	1400	180
124	14z0	1400	180
128	1300	1400	190

Caballo Nº	Valor Vivo	Valor Vitro	Kf
130	2100	2000	40
139	1300	1400	45
154	1400	1400	105
155	1500	1400	55
157	1200	1000	150
346	2000	1400	150
327	2000	1000	240
323	1200	1000	240
226	1000	1000	360
190	1100	1000	180
189	1600	1400	360
187	2000	2500	150
184	2000	2000	40
182	2000	2000	190
321	2700	2700	40
322	1600	1500	230
324	2600	2500	80
329	2500	2000	30
392	1600	1500	115
574	1400	1500	50
201	3000	2500	90
134	2500	2500	130
320	1300	1500	240
319	1400	1300	120
314	2000	2000	80
307	1000	1000	150
302	1500	2000	255
219	1200	1000	04
596	1400	1500	115
608	2500	2500	120
202	2100	2000	80
214	1400	1500	80
694	3000	3000	20
693	2000	1500	65
680	1000	1000	235
678	3000	2500	225
589	1400	1500	120
573	2500	2000	120
360	2500	2500	65
345	1400	1500	235
696	800	1000	no
697	700	800	180
699	1500	1500	90
707	1600	1500	180
712	1000	1000	150
713	2000	2000	110
718	2900	3000	235
778	2200	2000	55
677	1500	1500	230

Cotejando los valores "vivo" y "vitro" se observa que pocos son los sueros cuyos valores discrepan.

Sobre 54 sueros sólo dos caballos, el 346 y 573, son verdaderamente anómalos. Las diferencias encontradas en otros no cambian el resultado final del ensayo y permiten separar correctamente las sangrías exploradoras.

Por los tiempos de floculación (Kf) puede verse que prácticamente la medición se ha terminado a las 4 horas. Este método permite ahorrar tiempo y animales y creemos, por lo tanto, que puede ser usado con ventaja.

También hicimos mezclas perciales de estos sueros y fueron medidos en la misma forma. Los valores "vivo" y "vitro" corresponden.

CONCLUSIONES. — 1º Se describe un método que permite medir por floculación las sangrías exploradoras de tétano con buen resultado.

2º Con este objeto se prepara un toxoide tetánico purificado por concentración en frío con alcohol etílico a un pH determinado.

3º Este toxoide contiene los Lf iniciales y su relación de purificación es de 140 veces. Mayor purificación no es necesaria para la aplicación de este método.

4º Como suero patrón se emplea un suero antitóxico purificado por proteolisis pépsica.

5º En ningún caso se observaron dos zonas de floculación.

6º Por último, se da un cuadro con los valores obtenidos en 54 sangrías exploradoras de tétano.

BIBLIOGRAFÍA

(1) RAMÓN G., DESCOWBEY P. — *C. R. Soc. Biol.* 95, pág. 434 (1926
(2) ABT G. Y ERBER B. — *An. Inst. Pasteur* 40, pág. 659 (1926)
(3) KALIC D., — *C. R. Soc. Biol.* 98 pág. 649 (1928).
(4) SCHWIDT, S. — *An. Inst. Pasteur*, 42, pág. 63 (1928).
(5) DARZINE, E. — *An. Inst. Pasteur* 43, pág. 1499 (1929).
(6) RAWÓN, G. y DESCOMBEY, P. — *C. R. Soc. Biol.* 124, pág. 414 (1937).
(7) PREVOT, A. R. — *C. R. Soc. Biol.* 127, pág. 11600 (1938).
(8) MUELLER y MILLER — *J. of Bact.* 56, pág. 219 (1948) y *J. of Imm.* 50, pág. 377 (1945).
(9) GOLDIE, H., PARSON, C. H. y BOWERS, M. S. — *Infect. Dis.* 71, pág. 212 (1942).
(10) SORDELLI, A. — MODERN, F. y FERRARI, J. — *Riv. di Pat. Comparata*, sept. - oct. (1937).
(11) MODERN, F., RUFF, G. y GATTI, A. — *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 24. pág. 181 (1948).