

Preparación de toxina diftérica

Un nuevo medio. Obtención del toxoide. Fabricación de elementos requeridos por el medio

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

La producción de una buena toxina diftérica es un problema de todo momento y de la mayor importancia, en los laboratorios que se dedican a la elaboración de vacuna y de suero antidiftéricos.

Innumerables fórmulas y variantes y un gran número de procedimientos han sido publicados y ensayados con variable éxito en todas partes. Nuestro Instituto no ha estado ajeno a esas dificultades y uno de los autores recuerda que ya en el año 1917 comenzó a ocuparse del asunto y puede decir que no lo ha dejado de lado hasta el presente.

Los estudios sistemáticos acerca de la nutrición de la bacteria de Loeffler y de las condiciones de formación de la toxina, realizados por Pappenheimer y sobre todo por Mueller, establecieron de una manera relativamente precisa las substancias que constituyen el medio de cultivo óptimo cuya composición química es definida, pues está formado por substancias cristaloides y relativamente simples.

Con esos medios básicos se han preparado las toxinas que han servido para el estudio de su constitución química, hecho que tiene una gran importancia en los estudios de la inmunidad y además esos medios se han revelado excelentes para resolver el problema de la producción regular de toxinas muy activas, lo cual importa un verdadero progreso en la industria de la vacuna y del suero antidiftéricos.

La investigación de que trata esta comunicación fué iniciada como resultado de consideraciones de orden práctico y con ella contribuimos a la solución de un problema local de importancia económica.

Entregado para publicarse en abril de 1943.

La ley de vacunación antidiférica (N.º 12.670) establece por su reglamentación (Decreto 104.166) una primera vacunación antes de los dos años de edad, la segunda un año después, la tercera entre los 5 y los 6 años, la cuarta entre los 8 y los 9 años y la quinta entre los 11 y 12 años.

Esto importa la vacunación anual de \pm 2.500.000 niños (suponiendo que haya de 400.000 a 500.000 niños de cada edad entre uno y los 12 años de edad); además de esto hay que considerar que todos los niños que deben vacunarse o revacunarse en el primer año de la aplicación de la ley, son todos los que tienen de 1 a 12 años, es decir aproximadamente 5 a 6 millones.

En el segundo año de aplicación de la ley el número es aproximadamente igual y desde entonces la cifra baja a la de 2.500.000 de dosis por año, que ya fué mencionada.

La suma de \$ 200.000 destinada a sufragar los gastos de la vacunación alcanza para la realización de este plan con los precios de antes de la guerra; hoy por la elevación de esos precios se produciría un déficit que no hubiera interferido, sin embargo, de manera muy seria con el plan adoptado.

Al mismo tiempo que se votaba la ley y se dictaba el reglamento, se proseguían los estudios de la conservación de la inmunidad y del nivel de protección para asegurar el éxito de la vacunación; por otra parte, la literatura contiene antecedentes cada vez más numerosos de la frecuencia de difteria entre los vacunados correctamente, sin que el número de dosis aplicadas haya sido garantía de absoluta refractariedad, cosa por otra parte fácil de comprender apenas se reflexione a) sobre los riesgos de contagio donde haya muchos portadores, b) la reducción natural de la inmunidad antitóxica por el solo correr del tiempo, y c) la variable desconocida de la susceptibilidad individual. Si se piensa que por la vacuna antidiférica se debe inyectar tantas veces cuantas sean necesarias para alcanzar una inmunidad extraordinaria y permanente, se incurre en dos errores, uno de orden psicológico y otro económico. El primero, porque el número de inyecciones sería tal que la población se resistiría y sería imposible llevar a cabo esa vacunación ideal, y el segundo porque el costo de la aplicación de la vacuna crecería de manera tal que no guardaría proporción con los resultados.

Estas reflexiones, que han servido de base para estudios anteriores y para la adopción de la práctica de vacunación usada desde hace muchos años (sobre todo en las escuelas de la Capital Federal por la obra encomiable del Cuerpo Médico Escolar, donde se han logrado resultados excelentes) guiaron también la preparación del reglamento de la vacunación que en sus artículos 8, 9, 10 y 11 trata de formas y épocas de vacunación. Precisamente el artículo 10 dice y « en forma facultativa podrán efectuarse inyecciones complementarias, *instilaciones* o *pulverizaciones* de anatoxina para conferir un mayor grado de inmunidad individual », etc. Es decir, para incrementar la inmunidad y hacer que los sujetos así tratados sean prácticamente refractarios. Se trata, como se ve, de la aplicación de tres métodos distintos, pero todos de buena eficacia; uno de ellos, el de la inyección, requiere poca vacuna pero exige un grado de comprensión y de cultura y recursos que están fuera de la realidad para la mayoría de la población, así como de las organizaciones sanitarias o asistenciales de nuestro país, y además tiene otro de los defectos que hemos referido anteriormente.

En cambio los métodos de instilación o pulverización pueden ser aplicados fácilmente por razones de técnica y de psicología y lo único que se requiere es *disponer de vacuna en cantidad suficiente para realizar esa campaña en todo el país.*

De acuerdo con la literatura y la experiencia personal se decidió promover y difundir el uso de la vacuna por instilación y pulverización para mantener alto el nivel de inmunidad y el cálculo de la cantidad de vacuna necesaria para ese plan dió la cifra de aproximadamente 1.000.000.000 de Lf de toxina por cada año.

Como se comprende, el proyecto era irrealizable con el dinero acordado, y el plan expuesto sólo pudo ser considerado cuando se lograron los resultados de que da cuenta esta comunicación.

La distribución de la partida acordada para la vacuna antidiftérica (\$ 200.000) se hizo, por lo tanto, para preparar la cantidad de 1.000.000.000 de Lf por el método descrito en las páginas que siguen, y los gastos, sueldos y cargos, son la consecuencia de ese proyecto y del progreso que significa la aplicación de un procedimiento que tiene la ventaja de su mayor rendimiento a un menor costo, lo que permite destinar una mayor suma de dinero a sueldos de personal encargado de la producción de la toxina, con elementos y materias primas de origen nacional.

ANTECEDENTES

Pappenheimer y Johnson ⁽¹⁾ luego Pappenheimer, Mueller y Cohen ⁽²⁾ demostraron que la bacteria de Loeffler produce toxina de buena actividad en medios libres de peptona, constituidos por amino-ácidos y otras sustancias químicamente definidas. Estos medios, sin embargo, no tenían mucho valor práctico por su costo elevado y por la dificultad de preparación. Una solución parcial de estas dificultades fué encontrada por Pappenheimer ⁽³⁾ y por Johnson, Pappenheimer y Robinson ⁽⁴⁾ que descubrieron medios más perfeccionados pero que aún continuaban siendo muy caros y exigían el empleo de una gelatina muy purificada.

J. H. Mueller ⁽⁵⁾ a quién se debén estudios importantes sobre la nutrición de la bacteria de Loeffler, retomó la cuestión de la producción de toxina y dió al problema una solución relativamente simple y práctica, utilizando un hidrolizado de caseína con HCl librado de hierro, como fuente principal de nitrógeno, adicionado de β -alanina, ácido pimélico, ácido nicotínico, cistina, sales de Cu, Zn y Mn; el hierro debe encontrarse dentro de ciertos límites de concentración. Como fuente hidrocarbonada usó maltosa. El medio da hasta 60 Lf por cm³. Más tarde el mismo autor ⁽⁶⁾ con Miller P. A. y con Johnson E. R. ⁽⁷⁾ encuentra que el factor limitante de la producción de toxina es la concentración relativamente alta de ClNa que se forma al neutralizar con NaOH al HCl del hidrolizado de la caseína. La solución de estas dificultades la encuentran estos autores por precipitación del Cl⁻ por el OPb y la eliminación de éste por el SBa y la del Ba por SO₄H₂. El líquido conserva en solución el Cl⁻ del Cl₂Pb, que es soluble a la temperatura de 35°-40°C

en que se realiza la purificación. Las operaciones de la preparación son simples pero tediosas, y es necesario disponer de las substancias convenientes para que el hidrolizado final después de precipitado por Cl_2Ca y PO_4 contenga muy poco hierro.

Las soluciones para completar el medio de cultivo, son las mismas ya descritas en (5).

Cuando las proporciones de N, maltosa e hierro, son las óptimas se obtiene hasta 100 Lf por cm^3 . Hay causas de fracaso y entre ellas la más importante parece ser la de la cantidad variable de hierro que puede contaminar los frascos que se utilizan para la siembra.

El costo del medio es bajo y su constitución bastante bien definida permite reproducirlo con relativa facilidad.

En esta comunicación, exponemos brevemente nuestra experiencia y la solución que hemos considerado más conveniente para nuestras condiciones de trabajo y con el objeto de la preparación en gran escala de vacuna y suero antidiftéricos.

I

a) APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE MUELLER (*).— El autor aconseja el empleo de cualquier caseína comercial molida finamente; en nuestros primeros ensayos utilizamos la preparada por la British Drug Houses y se obtuvo un hidrolizado que se libró de Cl^- con facilidad. En cuanto a la eliminación del hierro no fué cosa fácil, pues la caseína utilizada contiene Ca^{++} en exceso y poco PO_4 , de modo que las proporciones de estos dos iones no fué adecuada para la buena precipitación del hierro, habiendo quedado en el líquido un exceso de Ca^{++} ; aumentando la cantidad de PO_4 se pudo obtener con facilidad un líquido prácticamente libre de hierro.

La composición final del medio aproximadamente, es la siguiente:

(*) En el mes de junio de 1940 el Prof. J. H. Mueller tuvo la gentileza de poner a la disposición de uno de nosotros los originales de su trabajo, aún no publicado, e informarnos de todos los detalles del método y realizar el modus operandi en sus laboratorios de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, para la obtención del hidrolizado de caseína. Expresamos al Prof. Mueller nuestro agradecimiento por su generoso auxilio.

	Substancias expresadas en gramos en 103 cm ³ de medio	Fe (en SO ₄ Fe, 7 H ₂ O)
Hidrolizado de caseína. 1,25 % de N. Vol. 20 cm ³	N = 0,25 ClNa = 0,58 PO ₄ HNa ₂ = 0,05 PO ₄ H ₂ K = 0,01	0
Sol: II.*Vol. 0,2 cm ³	β alanina = 0,00022 Ac. nicotínico = 0,00022 Ac. pimélico = 0,000015 SO ₄ Mg 7 H ₂ O = 0,044 SO ₄ Cu 5 H ₂ O = 0,0001 SO ₄ Zn 7 H ₂ O = 0,00008 Cl ₂ Mn 4 H ₂ O = 0,00003	3
Sol. III.*Vol. 0,14 cm	Cistina = 0,028	3,5
Sol. V.*Vol. 2,5 cm ³	Maltosa = 1,25 gr Cl ₂ Ca 2 H ₂ O = 0,012 gr	0
H ² O. 80 cm ³	H ² O = 80 gr	

Con este medio de cultivo se hacen 7 diferentes ensayos con cantidades distintas de hierro agregando, desde 0 a 600 γ de SO₄ Fe 7H₂O por litro de medio. En otra serie se usa una cantidad mayor de maltosa (1,75 % en vez de 1,25 %).

Ensayo	Fe total por litro expresado en SO ₄ Fe 7 H ₂ O en γ	Maltosa 1,25 %		Maltosa 1,75 %	
		A los 6 días		A los 6 días	
		Lf	pH	Lf	pH
1	70	60	7,2	40	6,8
2	170	50	7,4	50	6,8
3	270	50	7,6	60	6,8
4	370	60	7,6	60	6,8
5	470	30	8,0	60	6,8
6	570	40	7,8	60	6,8
7	670	25	7,8	60	7,2

(*) Ver pág. 90.

Los resultados de estos ensayos, que fueron los primeros realizados, muestran que el procedimiento de Mueller es fácil de aplicar y permite obtener con seguridad una excelente toxina.

La preparación en frascos grandes da una toxina de 45 Lf (con 1,75 % de maltosa y 370 γ de hierro por litro).

Con otros hidrolizados preparados con una caseína corriente del comercio, cuyo contenido de PO_4 y Ca^{++} era el habitual, no hubo dificultad en la eliminación del hierro y se obtuvieron resultados excelentes, pues el valor de la toxina, en dos ensayos diferentes en frascos con 250 cm^3 de medio, fué de 80 Lf para una cantidad de hierro de 400-600 γ por litro, con 1,25 % de maltosa.

Esta toxina se transforma perfectamente en toxoide con 6 ‰ de formol a pH 7,6 con una pequeña reducción del valor. Por adición de ácido se obtiene la separación del toxoide, pero el rendimiento es apenas de poco más del 30 %. Agregando al toxoide del caldo de Mueller, un toxoide corriente que precipita muy bien por ácido, la recuperación no aumenta. Como esta dificultad es muy seria para adaptar el procedimiento de Mueller a nuestra técnica de fabricación de antígenos para inmunizar caballos y para preparar vacuna antidiftérica, resolvimos no utilizar el procedimiento a pesar de que sus ventajas son tales que hubieran podido inducir a cambiar los métodos de fabricación de la vacuna y de los antígenos para inmunizar caballos. Además, como se comprende fácilmente, el cambio de la vacuna debè ser justificado por un estudio muy documentado, de manera que hemos preferido abandonar por el momento el procedimiento de Mueller y recurrir a su adaptación a las condiciones de nuestros procedimientos de fabricación de la vacuna.

Por otra parte, en la obtención de varios hidrolizados de caseína encontramos alguna dificultad en la eliminación del hierro, de modo que este hecho agregado a algunas otras dificultades nos hizo abandonar el procedimiento como método de rutina.

b) PREPARACIÓN DE UN CALDO ACTIVADO POR LAS SUBSTANCIAS USADAS EN EL MEDIO DE MUELLER. — Se emplearon 3 diferentes hidrolizados de caseína (1-3-4) librados de hierro, los que agregados en la proporción del 5 % a un caldo común con 2 % de peptona, 5 ‰ de ClNa y 1 % de maltosa, aumentan de manera considerable la producción de toxina.

Una vez demostrada la activación, era lógico suponer que si la dificultad de obtener un hidrolizado para producir toxina en un

medio sintético estaba constituida por la necesidad de eliminar el ClNa y el hierro, esta dificultad desaparecía en el caso de usar el hidrolizado y las demás substancias del medio de Mueller, sin cuidarse de eliminar el Fe y reducir los cloruros como activadores de un caldo corriente (*) cuyo déficit en substancias esenciales fuera la causa de la pequeña producción de toxina. Después de un número muy grande de ensayos se llegó a establecer que en las condiciones que se describen a continuación se obtiene un caldo con el cual se produce una toxina muy activa con regularidad.

PREPARACIÓN DEL HIDROLIZADO. — Se usa la técnica Mueller pero con algunas variantes, descritas a continuación:

A 500 gramos de caseína del comercio, en gránulos pequeños, se le agregan 3 litros de HCl 9N y una vez disuelta se la hace hervir suavemente por 18 horas con llama directa en un balón con refrigerante a reflujo; para regularizar la ebullición se usan unos pequeños trozos de antracita.

El líquido se evapora al vacío en baño-maría, hasta que no destiló más; esta operación se completa en 4 horas aproximadamente.

Al residuo se le agrega 1 litro de agua hirviendo y una vez disuelto se lleva a pH 5,5 con NaOH (± 800 cm³ de NaOH al 20 %) y se decolora con 200 gr de carbón animal, filtrando por papel plegado. Se lava el residuo con agua destilada caliente y el filtrado se completa a 4 litros.

El líquido, de color amarillo naranja, contiene 1,4 % de nitrógeno y 6,6 % de Cl (expresado en ClNa). Se conserva bien a temperatura ambiente una vez esterilizado por simple ebullición.

PREPARACIÓN DEL CALDO. — a) agua de carne. 1 kg de carne de ternera molida finamente, se hierve por 30 minutos con 2 litros de agua destilada y se filtra por papel. Se completa el filtrado a 2 litros.

b) a 500 cm³ de agua de carne se agregan 450 cm³ de agua, 50 cm³ del hidrolizado de caseína, 20 gr de peptona, 1,7 gr de ClNa, 0,60 cm³ de la sol. II de Mueller (***) y 0,42 de la sol. III (***) de Mueller. Se agrega NaOH hasta pH 8,3 hierve y filtra por papel.

(*) Es conocido que en los medios peptonados la influencia del hierro es muy poco importante.

(**) Ver pág. 86.

El caldo se distribuye en frascos de cultivo (100 cm³ en c/u) y esteriliza a 0,7 atmósferas durante 20 min (*).

c) Una vez esterilizado el caldo se le agrega 2 cm³ de maltosa en solución estéril al 50 % (Solución V de Mueller).

OBTENCIÓN DE LA TOXINA. — Es muy importante elegir una cepa adecuada al caldo y al método de trabajo. En nuestros ensayos hemos utilizado la cepa Toronto (Park 8) entregada por el profesor H. J. Mueller.

Con otras siete cepas, entre las cuales habían 4 de origen Park Williams 8, se obtuvieron resultados menos favorables. La cepa es conservada en vacío seco sobre P₂O₅ en heladera. Antes de usar se transplantó en el caldo corriente de difteria sin los activadores. Para la producción de toxina se usa un cultivo de 24 horas a 34°C.

SOLUCIONES DE MUELLER

Sol. II	Sol. III	Sol. V
SO ₄ Mg 7 H ₂ O 22,5 gr	cistina 20 gr	maltosa 50 gr
β-alanina 0,115 »	HClD = 1,19 20 cm ³	CaCl ₂ 2 H ₂ O 0,5 »
Ac. nicotínico 0,115 »	H ₂ O hasta 100 »	H ₂ O hasta 100 cm ³
Ac. pimélico 0,0075 »		Agregar 60 cm ³ de agua a
SO ₄ Cu 5 H ₂ O (1 %) 5,0 cm ³		50 gramos de maltosa,
SO ₄ Zn 7 H ₂ O (1 %) 4,0 »		agitar, agregar el Ca
Cl ₂ Mn 4 H ₂ O (1 %) 1,5 »		Cl ₂ 2 H ₂ O sólido, calen-
HCl D = 1,19 3,0 »		tar ligeramente agitan-
H ₂ O hasta 100 cm ³		do y completar a 100
		cm ³ . Esterilizar a 10
		libras durante 10'.

Los frascos colocados previamente en la cámara estufa a 34° se siembran con ansa; al cabo de 3 días se obtiene ya la máxima producción de toxina.

II

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRODUCCIÓN DE TOXINA. — a) *Comparación entre el método de Mueller y el descrito más arriba.*

Se usa un medio de Mueller con 600 γ de hierro y 1,25 % de maltosa en frascos con 100 cm³ y un medio tal como el descrito

(*) Se obtienen mejores resultados si se esteriliza por filtración por bujía Chamberland. En este caso la maltosa (2 cm de la solución V se agrega después de la ebullición y antes de la filtración).

más arriba (lo designaremos MIB, abreviado de Mueller Instituto Bacteriológico) con 2 % de peptona Parke Davis, con 1 % de maltosa filtrado por bujía Chamberland en frascos también con 100 cm³. La producción de toxina y sus constantes están expuestas en el cuadro que sigue:

Tiempo de incubación	Caldo Mueller					Caldo MIB				
	pH	Lf cm ³	L + cm ³	DLM cm ³	L +	pH	Lf cm ³	L + cm ³	DLM cm ³	L +
48 h	7,8	30	—	—	—	8,2	60	35	3000	86
72 »	7,8	60	40	3000	75	8,2	70	45	3000	66
96 »	8	70	45	4000	93	8,3	80	45	4000	93
116 »	8,2	70	45	3000	66	8,4	70	50	3000	60
144 »	8,3	70	40	2000	50	8,6	70	50	4000	80
192 »	8,4	60	35	1000	28	8,8	70	50	3000	60

En este cuadro aparece evidente la bondad del nuevo medio (MIB), la rapidísima producción de toxina y la conservación del poder tóxico al prolongar la incubación; los valores con el medio de Mueller son muy parecidos, aunque un poco más bajos y la toxina pierde su toxicidad con el tiempo.

b) *La influencia del agregado de los activadores a caldos con distintas peptonas.*

Se usan medios esterilizados, con 1 % de maltosa y diferentes peptonas; frascos con 100 cm³; 3 días de incubación a 34°.

VALOR DE LA TOXINA EN EL MEDIO EN Lf/cm³

Clase de peptona	Caldo corriente	Caldo M I B
PD	30	50
I. B. (N° 2)	10	50
PD	40	65
I. B. (S L)	20	50
I. B. (L)	5	30
I. B. (Seca)	20	50
Martin	15	60
M	30	50
R	30	40
E	10	30
C	30	40
V	10	30
T° M°	21	45

Las iniciales indican diferentes marcas de peptona; I. B es una peptona del Instituto Bacteriológico.

La capacidad de activar la producción de toxina es evidente en todos los casos y es tanto mayor cuando más bajo es el valor de la toxina en el caldo simple. Resultaría así, que cualquier peptona de digestión péptica, puede ser utilizada para preparar toxina diftérica de discreto o buen valor. Como los caldos fueron preparados por esterilización y no por filtración, los valores que se han obtenido son menores, de manera que la bondad del método es aún mayor que la que aparece en el protocolo.

c) Posibilidad de usar maltosa y otras sustancias de mediana pureza.

La variación de la toxinogénesis por la influencia del hierro es menos marcada en los caldos con proteínas complejas, de modo que el medio de cultivo descrito tiene la ventaja de no exigir la limpieza extraordinaria que es necesaria para el medio de Mueller y Miller. Esta característica facilita además el uso de sustancias de menor pureza en cuanto al contenido de hierro, y así hemos procedido, estudiando la posibilidad de utilizar maltosa preparada en el laboratorio por métodos relativamente simples. Como también se han preparado cistina, ácido pimélico y β -analina, se puede decir que el medio de cultivo puede ser íntegramente obtenido con los recursos de un laboratorio corriente.

La maltosa es, de entre todas las sustancias del medio, la que importa un mayor costo (70 % del total en el medio de Mueller).

Los resultados de algunos experimentos expuestos a continuación revelan la utilizabilidad de la maltosa preparada en el mismo laboratorio por acción de la amilasa.

Maltosa 1 %	Lf			
	Caldos a	b	c	d
Difco	46	46	50	60
Instituto	50	60	46	46

III

LAS PROPIEDADES DE LA TOXINA PARA PREPARAR TOXOIDE. — Como ya lo hemos dicho, en la técnica usada en el Instituto para preparar la vacuna y el suero antidiftérico, se requiere un toxoide que tenga la propiedad de precipitar por acidificación y que conserve una buena capacidad antigénica. También hemos mencionado que el caldo sintético de Mueller no se presta para este objeto, de manera que si el caldo MIB da un toxoide adecuado, se lo puede usar en substitución del que se prepara actualmente en el Instituto.

A continuación, se exponen los resultados de la atenuación, precipitación y purificación con el caldo MIB preparado con distintas peptonas; además se describe una variante de la técnica de la purificación, usada en la actualidad.

ATENUACIÓN DE TOXINAS DE 3 Y 8 DÍAS PREPARADAS EN EL CALDO M I B

pH 7,6						
FORMOL						
Incubación a 38° C	4 por mil		5 por mil		6 por	
	Toxina de		Toxina de		Toxi	
	3 días	8 días	3 días	8 días	3 días	
	kf toxicidad					
10 días	30' +	45' +	35' +	50' 0	40' 0	
15 »	30' +	40' 0	35' +	45' 0	40' 0	
20 »	30' +	40' 0	35' ±	45' 0	— —	

El toxoide tiene 69 Lf en todos

4 DIFERENTES PH, TIEMPOS Y CONCENTRACIÓN DE FORMOL. T = 38° C

pH 8,2						
FORMOL						
mil	4 por mil		5 por mil		6 por mil	
na de	Toxina de		Toxina de		Toxina de	
8 días	3 días	8 días	3 días	8 días	3 días	8 días
kf toxicidad						
60' 0	35' +	45' +	40' +	55' +	45' ±	65' 0
60' 0	35' +	40' ±	40' +	45' 0	45' 0	60' 0
— —	35' +	40' 0	40' ±	45' 0	— —	— —

los ensayos realizados.

Es evidente que la toxina de 3 días tiene una mayor resistencia a la atenuación, así como un menor tiempo de floculación para un valor de Lf igual; la atenuación se efectúa con más rapidez a pH 7,6.

Se adopta como técnica la de atenuar a 38° con 6‰ de formol a pH 7,6 usando toxina de 3 días de incubación durante 15 días.

Con el toxoide preparado de esta manera se ensaya la precipitación ácida a pH 3,8 repitiéndola 2 veces y la pérdida alcanza apenas al 15,5 %. *En consecuencia la toxina preparada por 3 días de incubación en el caldo MIB se presta perfectamente para la obtención del toxoide precipitado por ácido.*

La purificación del toxoide que proviene de toxinas de 3 días y de toxinas de 8 días, permite obtener toxoides de diferente pureza, siendo algo mayor para la toxina de 3 días de incubación.

	γ de proteínas para cada Lf de toxoide		
	Precipitado por ácido	Precipitado por ácido y decolorado por carbón	Toxoide de rutina
Toxina de 3 días	8,6	7,5	21
» » 8 »	9,4	9,2	

El valor antigénico de esos toxoides de 3 días, 8 días y el de rutina, determinado por inoculación de cobayos por la técnica corriente es el mismo.

Los ensayos fueron por último realizados con la toxina obtenida con un caldo MIB, preparada con todos los elementos fabricados en los laboratorios del mismo Instituto y los resultados fueron iguales. La técnica descrita a continuación debe ser considerada la definitiva para la obtención del toxoide purificado, que debe reemplazar al actualmente empleado en la fabricación de la vacuna.

La toxina preparada en el caldo MIB de 3 días de incubación se atenúa a 37° durante 15 días a pH 7,6 con 6‰ de formol al 40‰.

Se precipita a pH 3,8 con SO₄H₂ y filtra por papel. El precipitado se seca entre papeles; se redisuelve en un volumen mucho menor y se precipita nuevamente por ácido a pH 3,8.*

Se separa el precipitado por centrifugación. Se disuelve el precipitado en poca agua pH 7,6. La pérdida total es del 20 %.

(*) Esta segunda precipitación puede ser omitida si se secan bien los papeles o se usa la centrifugación en vez de la filtración.

La solución del toxoide se trata por $Al(OH)_3$, de la manera descrita por A. Sordelli, J. J. Ferrari y E. Savino, o por una cantidad adecuada de carbón (± 1 mg por cm^3) a pH un poco inferior a 7 para permitir la separación del carbón por el filtro. La pureza del toxoide está comprendida entre 7 y 9 γ de proteína por cada Lf. Para el toxoide de uso nasal se puede omitir una precipitación por ácido y la purificación por $Al(OH)_3$ o carbón.

IV

Los costos de los diferentes medios que pueden prepararse actualmente, su rendimiento y el costo de cada 1000 Lf se encuentran expuestos en el cuadro que va a continuación. Los cálculos se han hecho para la preparación del medio hasta el momento de la distribución en los frascos de siembra, incluyendo sólo las substancias y la mano de obra.

	Medio de Mueller		Medio actualmente usado en el Instituto	Medio M I B
	En Estados Unidos según el autor* en 1940	En Buenos Aires en 1942	Precios de 1942	Precios de 1942
Hidrolizado de caseína	0,30	0,50		0,12***
Maltosa	1,23	2,50		2,00
Cistina	0,09	0,18		0,04
Otros elementos	—	0,02	—	—
Carne	—	—	0,20	0,20
Peptona	—	—	0,77	0,77
Glucosa	—	—	0,01	—
Mano de obra de preparación del caldo	**	**	0,20	0,20
Costo total de 1 litro	1,62	3,20	1,18	3,33
Costo de 1000 millones de Lf	16.000 (1)	32.000 (2)	59.000 (3)	55.000 (4)

Hidrolizado M I B***. Su costo:

500 g caseína	0,50
1 litro HCl	4,00
160 gr NaOH	3,00
200 gr carbón	0,90
Mano de obra	1,75
Total	10,15

(1) (2) Caldos que dan 100 Lf por cm^3 .

(3) Caldo de 20 Lf.

(4) Caldo de 60 Lf.

* El cálculo está hecho al cambio de 4,25 pesos por dólar.

** Mano de obra ya incluida.

Estas cifras indican la conveniencia de adoptar el procedimiento de Mueller y así se habría hecho de no mediar dos dificultades, una ya mencionada, que consiste en la pérdida grande en la purificación y otra muy seria también, que es ocasionada por las exigencias muy rigurosas de la técnica, pues el medio exige un contenido de hierro muy constante, lo que obliga a adoptar precauciones extraordinarias en la elección de la calidad del vidrio y en el lavado y manipulación de los frascos de cultivo. Con ello se elevaría enormemente el costo de producción de la toxina, hasta que no se construyeran locales especiales a prueba de «hierro» y se aplicara una técnica económica y muy buena de lavado.

Quedan pues, en consideración, los otros dos métodos restantes, cuyo uso es compatible con la técnica de preparación de la vacuna; uno de ellos da un rendimiento de 20 Lf por cm^3 y el otro de 60 Lf, de modo que, este último tiene la enorme ventaja de reducir a la tercera parte los volúmenes y la cantidad de muchos de los reactivos y de los materiales requeridos en la elaboración de la vacuna y podemos decir, además, que la mano de obra se reduce de allí en adelante a la *tercera parte*. Además de esta ventaja existe la de un costo algo menor, de modo que el procedimiento que debe adoptarse está basado en el uso del medio MIB.

La financiación de la fabricación de la vacuna no puede sin embargo realizarse satisfactoriamente si el costo del medio es de \$ 55.000 y es necesario reducir dicha cifra.

Como el medio MIB no requiere una gran pureza de las sustancias que lo constituyen, es posible considerar la fabricación en el laboratorio de sus componentes por procedimientos económicos y sencillos. A continuación se describen las técnicas de los métodos adoptados:

1°) PREPARACIÓN DE PEPTONA. — Se describen dos técnicas para dos materias primas diferentes.

a) *Peptona de plasma de caballo*. — Se emplea el plasma citratado al 3‰ de los caballos inmunizados cuyo valor terapéutico es muy bajo o el de animales normales.

A 180 kilos de plasma se le agregan 50 cm^3 de HCl concentrado para alcanzar un $\text{pH} = 6.6$.

Se repartió en ollas grandes y se coagula en un baño-maría de 85°C de temperatura. Cuando el líquido del interior alcanza la temperatura de 78°C se deja estar durante 30 minutos. Al día si-

guiente se separa el coágulo por tela filtrante y se lava una vez con agua destilada.

Se exprime bien y se obtienen 94 kilos de coágulo al que se le agregan 150 litros de agua destilada a 60°C, 2700 cm³ de ácido clorhídrico y 600 cm³ de ácido pirofosfórico (H₄P₂O₇) que fué preparado por calentamiento del ácido fosfórico a 220-240° (hasta que no diera coloración amarilla con NO₃Ag).

Luego se le agregan 12 kilos de mucosa de estómago de cerdo. El pH es de 1,6 (óptimo de acción de la pepsina). Se deja 24 horas a 50°. Se enfría después de este tiempo, se le agregan 780 gr de hidrato de cal y NaOH al 50 % hasta alcanzar un pH de 7,4. Se calienta a 95° y se filtra. Se obtienen 200 litros de solución con 1,2 % de N. Se evapora al vacío a baja temperatura hasta concentración siruposa y se puede obtener el polvo seco por pulverización en un secador de Krause.

b) *Peptona de carne*. — A 3 kilos de carne molida que así fué mantenida durante 3 días en la cámara fría de 0° 2°C, se le agrega 3,5 litros de H₂O destilada de 60°, que contienen 70 cm³ de HCl concentrado.

Aparte se prepara una mezcla de mucosa de estómago de cerdo con H₂O y HCl en la siguiente forma:

A 1500 gr de mucosa de estómago, lavado y molido se le agrega 1500 cm³ de H₂O destilada, que contienen 45 cm³ de HCl concentrado. Se mezcla bien y se deja 24 horas a temperatura ambiente antes de usar.

A la carne se le agrega en la primera etapa la mitad de la suspensión de mucosa antes descrita, ajustando el pH a 4. Se digiere en baño-maría a 40°C durante 24 horas; en este lapso sólo se ha digerido la mitad de la carne más o menos. Se agrega en esta segunda etapa la otra mitad de la mucosa y se ajusta de nuevo el pH a 3,8 - 4 con HCl concentrado y se deja otras 24 horas al baño-maría. Después de estas 24 horas de digestión, el pH se mantiene a 3,8 a 4. Al cabo de esta segunda digestión se enfría primero con agua y luego con hielo y se guarda 24 horas en la cámara fría para separar al cabo de este tiempo, por tela filtrante fina toda la grasa y el residuo no digerido. Se agrega luego, la cantidad necesaria de NaOH al 50 % para llevar a pH 7,2. Se hierve durante 3 minutos y se filtra por papél de filtro.

Se obtienen 8 litros de líquido con 1,25 % de N.

Se puede concentrar al vacío hasta consistencia de jarabe y secar luego por pulverización.

Ambas peptonas se pueden conservar en solución si se las esteriliza o si muy concentradas se las guarda a muy baja temperatura; se las puede también usar directamente con lo cual se ahorran operaciones y gastos.

El costo de la peptona de plasma, en solución, es de \$ 11 el kg y el de la peptona de carne de \$ 10 (*).

2) PREPARACIÓN DE MALTOSA. — La preparación de la maltosa utilizable en el medio descrito es relativamente fácil y su precio de costo es muy bajo.

La técnica utilizada para la obtención es la siguiente:

Un kilo de almidón de arroz o de trigo se suspende en un litro de agua fría agitando convenientemente y se lleva luego a pH 7,0 con NaOH al 4 %.

Se transforma en engrudo mediante el agregado de 8 litros de agua hirviendo con agitación constante, para evitar la formación de grumos.

Se coloca el engrudo en un frasco de paredes resistentes con tapa de goma y se le hace el vacío y se cierra a la llama el tubo de vidrio. Este método evita los inconvenientes derivados de la ebullición del engrudo al quitar la presión del autoclave; se lleva al autoclave 1,5 atmósfera por 1 y ½ hora.

Se acidifica con ClH-N hasta pH 5,7 - 5,8 dejando enfriar a 60°; entonces se agregan 100 gr de extracto enzimático del comercio (malta) disuelto en un poco de agua, corrigiéndose luego el pH si fuera necesario.

Con agitación frecuente se procede a la sacarificación, manteniendo la mezcla a 60 - 63° durante 10 - 12 horas. Al final de este tiempo se logra una débil reacción al iodo (rojo débil).

Se filtra por papel y concentra al vacío hasta 1 ½ litro, tratándose entonces con 5 volúmenes de alcohol de 96°; se agita y deja hasta el día siguiente. Las dextrinas precipitan rápidamente formando una pasta espesa. Se filtra; la filtración es rápida. El filtrado se concentra al vacío hasta consistencia de jarabe. Si se desea, se seca a presión reducida en caliente, obteniéndose un polvo ligeramente amarillo muy higroscópico.

* Calculado sobre contenido de N. El peso de los sólidos es mayor, pues contiene todo el Cl usado en la digestión al estado de ClNa y otras sales. Es indispensable cuando se usan estas peptonas completar el ClNa que contienen para que el caldo tenga 5 por mil como máximo.

Se determina el contenido en maltosa por polarimetría y por reducción de una sal de cobre. El rendimiento es de 50 % del peso del almidón. Con un rendimiento algo menor al anterior (47 %) se puede llevar a cabo la sacarificación prescindiendo del calentamiento en autoclave.

El costo de 1 kg de maltosa en solución al 50 % es de \$ 20.

Por último mencionaremos las técnicas usadas para preparar ácido pimélico β -alanina y cistina. El ácido nicotínico cuyo uso está muy extendido, se puede siempre obtener en plaza.

Acido pimélico. (Organic Synthesis Carl S. Marvel Ed., Vol. XI, pág. 42-45). Se lo prepara por reducción del ácido salicílico. El método parece que puede ser substituído con ventaja por el descrito por A. Müller en Monatsh. 65 pág. 18-20 (1934) con un rendimiento del 50 %.

β -alanina. (Organic Synthesis J. R. Johnson Ed., Vol. XVI, pág. 1-3 y 75-76). Se prepara a partir del ácido succínico; da un rendimiento del 41-45 %; es un método largo y las sustancias usadas, si bien comunes son costosas.

L-cistina. (Organic Synthesis H. Gilman Ed., Vol. Colectivo I, pág. 194-196). Se obtiene por hidrólisis de pelo humano. El método es sencillo y da un rendimiento de 5-5,3 % (*).

El costo del caldo por el empleo de los elementos preparados en el laboratorio se reduce considerablemente como se puede apreciar por el siguiente cuadro:

Hidrolizado	0,12	
Maltosa	0,20	
Cistina	0,04	
Carne	0,20	
Peptona	0,20	
Mano de obra de preparación del caldo	0,20	
Costo total de 1 litro	0,96	
Costo de 1000 millones de Lf** ...		15.000

Por tanto, con el empleo del medio descrito y designado como MIB, utilizando elementos y sustancias elaboradas en el propio

* La posibilidad de obtener un complejo a base de peptona que puede servir para preparar un caldo de difteria con el mínimo de dificultades, nos ha inducido a realizar ensayos mezclando con la peptona los activadores y la maltosa para desecar la mezcla; de esa manera sería susceptible de comercialización.

** Admitiendo que el caldo da toxinas de 60 Lf.

Instituto, se puede reducir su precio de costo a cifras compatibles con los fondos que se han votado para la preparación de la vacuna antidiftérica; cuando su elaboración se haya organizado se podrá disponer de toda la vacuna que requiere el país para la aplicación integral de la ley 12.670.

CONCLUSIONES

1° — Se describe:

a) Un medio de cultivo de preparación relativamente simple que da regularmente toxina de buena actividad (50-80 Lf) en corto tiempo de incubación.

b) Los métodos de preparación de peptona y de maltosa.

2° — El costo de la toxina preparada en ese medio de cultivo es muy bajo.

3° — El toxoide preparado con esa toxina puede purificarse fácilmente y se adapta bien a la técnica de preparación de la vacuna antidiftérica del Instituto Bacteriológico.

BIBLIOGRAFIA

1. PAPPENHEIMER, A. M. JR.; JOHNSON, S. J. — *Brit. J. Exp. Path.*, 335, 1936.
2. PAPPENHEIMER, A. M. JR.; MUELLER, J. H.; COHEN, S. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 36, 795, 1937.
3. PAPPENHEIMER, A. M. JR. — *Brit. J. Exp. Path.*, 17, 342, 1936.
4. JOHNSON, S. J.; PAPPENHEIMER, A. M. JR.; ROBINSON, E. S. — *J. Bact.*, 35, 8, 1938.
5. MUELLER, J. H. — *J. Immunol.*, 37, 103, 1939.
6. MUELLER, J. H.; MILLER, P. A. — *J. of Bact.*, 40, 21, 1940.
7. MUELLER, J. H.; JOHNSON, E. R. — *J. of Bact.*, 40, 33, 1940.