

62
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IMPORTANCIA DE LA PURIFICACION DEL TOXOIDE
TETANICO EN LA RESPUESTA INMUNE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

IDALIA MARIA ANTONIETA FLORES ARGUELLO

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	<u>INDICE</u>	Pag
RESUMEN		1
INTRODUCCION		3
Generalidades:		
- <u>Clostridium tetani</u>		3
- Toxina Tetánica		6
- Patogenia		7
- Toxoide Tetánico		9
- Vacuna Antitetánica		10
- Competencia Antigénica		14
OBJETIVOS		26
MATERIAL Y METODOS		27
RESULTADOS		39
DISCUSION Y CONCLUSIONES		63
APENDICE		71
LISTA DE FIGURAS		81
LISTA DE TABLAS		82
BIBLIOGRAFIA		83

RESUMEN

La alta especificidad de la toxina tetánica por el sistema nervioso central, permite considerar que las reacciones secundarias -- (generales y locales) observadas durante la aplicación del toxoide en h manos se deben a la presencia de contaminantes presentes en el medio de cultivo durante la destoxificación, los cuales se demuestran cuando se a naliza el toxoide en un sistema de Inmunolectroforesis utilizando suero de animales inmunizados con toxoide tetánico crudo, y donde se encuentran más de 10 contaminantes.

Con la finalidad de estudiar la influencia de los contami-- nantes del toxoide en la respuesta inmune, se obtuvieron a partir de dos medios de cultivo diferentes (Müller y Miller y Latham), 3 preparaciones de toxoide tetánico de cada uno, utilizando técnicas bioquímicas de purifi cación, como son precipitaciones con sales, precipitación alcohólica y cromato grafa en gel.

Se estudió la respuesta inmune utilizando el mismo esque- ma de inmunización en 6 grupos de conejos; inmunizados con las prepara ciones de toxoide crudo concentrado, toxoide precipitado con sulfato de amonio y toxoide purificado con Sepharosa 4B-200; todos los toxoides es- tandarizados con 200 Lf/ml.

La concentración de anticuerpos neutralizantes se midió de acuerdo a la técnica de IPSEN y utilizando el sistema de Read-Muench, se obtuvieron los datos finales, cualitativamente la respuesta de anticuerpos se evaluó por inmunolectroforesis.

La pureza de las diferentes preparaciones se estudió me-- diante las técnicas de Inmunolectroforesis y Electroforesis en geles de - acrilamida - SDS.

El análisis del grado de pureza realizado con Electrofore - sis en geles de acrilamida-SDS mostró que los toxoides preparados, a par tir de toxina tetánica cruda, representan una mezcla heterogénea de polí meros moleculares, unidos por puentes metilénicos que impiden su separa ción. (45,46).

La inmunolectroforesis mostró que con las técnicas utilizadas, no se logra purificar el toxoide dado que se observan de 5 a 7 bandas de precipitación en cada preparado. Sin embargo el análisis de los toxoides muestra que mediante la cromatografía en Sepharosa 4B-200 se logra incrementar la actividad específica de los mismos de 1-2 veces.

Los resultados de los grupos inmunizados con toxoide crudo y los inmunizados con los toxoides purificados, muestran que la concentración de Unidades Antitóxicas en el suero de los segundos se incrementa 2-3 veces. Aunque existen antecedentes de que los contaminantes presentes en las preparaciones crudas de toxoide tienen efecto de adyuvante, en este trabajo se encontró que la mayor capacidad inmunogénica corresponden a los toxoides con menor número de contaminantes.

INTRODUCCION.

El tétanos (del griego tetanus=contracción) es una enfermedad causada por una toxina bacteriana que afecta al hombre y varias especies de animales. Es conocida desde el inicio de la medicina, se encuentran descripciones en los escritos de Hipócrates hace 24 siglos y a través de múltiples escritos de los médicos antiguos, los cuales la describieron - junto con enfermedades que causan epidemias tales como la peste, viruela y otras, considerándose siempre como una de las primeras causas de muerte.

Actualmente a nivel mundial, esta enfermedad constituye un problema importante de salud pública; se calcula que anualmente mueren alrededor de un millón de personas (Bytchenko, 1975. (1)). En México, se registran como promedio 2,000 muertes de personas al año, de las cuales el 69% corresponde a recién nacidos, como se muestra en la Tabla I. Esta frecuencia origina problemas económicos serios debido a que los enfermos deben permanecer hospitalizados durante días o semanas aplicándoles un tratamiento constituido principalmente por antisueros específicos. (5).

La distribución geográfica de esta enfermedad se relaciona directamente con factores ecológicos y socioeconómicos, lo cual explica -- por qué en Africa, Asia y Latinoamérica sea más frecuente, que en Europa y Norteamérica según Bytchenko, et. al. 1982. (1).

Agente Causal:

Clostridium tetani

En 1884, Nicolăire describió por primera vez el bacilo del tétanos, en el pus tomado de ratones y otros animales que habían muerto, después de inocularlos por vía subcutánea con pequeñas cantidades de tierra. Posteriormente Kitasato aisló el microorganismo en 1889, y demostró su papel causal, así como la incapacidad del bacilo del tétanos para invadir el torrente sanguíneo, comprobando con esto que la enfermedad es una intoxicación.

Morfología.

Los bacilos del tétanos son bastones delgados, móviles (20 a 30 flagelos periféricos), grampositivos, esporulante, con extremos redondeados. Por lo común miden de 0.3 a 0.5 μm de largo, aunque se han observado filamentos vegetativos de mucha mayor longitud. La espora es esférica y terminal de mayor diámetro que el bacilo; las formas que contienen esporas tienen un aspecto característico en palillo de tambor.

Las colonias aisladas en agar glucosado por punción profunda, tienen aspecto lanoso y pueden ser floculentas o presentar un centro opaco; las que crecen en la superficie del medio son planas, risoides e incluso plumosas, y con frecuencia pasan de 1 mm de diámetro, en agar sangre producen hemólisis.

Fisiología.

Clostridium tetani es anaerobio estricto y requiere para su desarrollo de un potencial de óxido reducción bajo, al igual que otros anaerobios. El bacilo del tétanos crece en medios sintéticos, pero sus necesidades de crecimiento son relativamente complejas; incluyendo los aminoácidos arginina, histidina, tirosina, valina, leucina y triptofano; las vitaminas riboflavina, ácido pantoténico, tiamina, ácido fólico, biotina, piridoxina y ácido nicotínico; adenina, uracilo y ácido oleico.

El hierro se utiliza en muy pequeñas cantidades, un medio de caldo de carne conteniendo estómago de cerdo autolizado, infusión de corazón de buey o digerido tróptico de caseína, junto con glucosa, carbonato de potasio, magnesio y fosfato, permite que se produzca toxina en título alto. (3).

En cultivo puro, al igual que en otros anaerobios la glucosa estimula el crecimiento, aunque Cl. tetani no fermenta a éste ni otros hidratos de carbono.

El crecimiento del bacilo sembrado por punción en gelatina es lento a 22°C, los medios sólidos que contienen cerebro y carne pueden suavizarse ligeramente pero nunca se digieren por completo, el bacilo por lo tanto es ligeramente proteolítico. Los aminoácidos se utilizan rápidamente, por ejemplo, el ácido glutámico, el aspártico y la serina son atacados directamente con formación de CO₂, NH₃, ácido acético y butírico. Tanto los aminoácidos como los compuestos de carbono son deshidrogenados fácilmente. En leche con tornasol se reduce el indicador y a veces hay una ligera precipitación de la caseína, los nitratos no se reducen a nitritos, — pero se produce sulfuro de hidrógeno e indol.

La formación de esporas, es un factor importante en esta enfermedad ya que Ci. tetani, generalmente llega al organismo en su forma esporulada. La producción de esporas comienza en uno o dos días a temperatura ambiente; la esporulación se inhibe fácilmente por la acidificación del medio, sin embargo se estimula en cultivo por la presencia de iones como K⁺, Mn²⁺ y Cl⁻.

Las esporas son muy resistentes y permanecen viables por años cuando se protegen de la luz y el calor. Theobald Smith demostró — que esporas de algunas cepas resisten vapor de agua durante 60 minutos, el fenol al 5 % destruye las esporas del Ci. tetani en 12 horas y con adición de ácido clorhídrico al 0.5% se logra en dos horas. (4).

Estructura antigénica.

El bacilo del tétanos antigénicamente es heterogéneo, se — han descrito varios tipos los cuales se han designado con números romanos, en la actualidad se conocen 10 en total (I al X), incluyéndose antígenos — somáticos y flagelares. Los tipos II, IV, V y IX tienen un antígeno común denominado O, que da por resultado reacciones cruzadas. A pesar de que existe gran variación antigénica en el bacilo, la toxina formada por todos estos tipos es inmunológicamente idéntica. (1).

Toxina tetánica.

En 1890, Knud y Faber demostraron la existencia de una toxina, al provocar experimentalmente tétanos, en animales inyectados con filtrados crudos de Cl. tetani, la toxina fue aislada por primera vez por Pillemer et.al. en 1948, y a partir de esta fecha se han realizado numerosas investigaciones sobre la toxina como los estudios de Dawson-Mauritzen 1967, Murphy 1967, Bizzini, et. al. 1969, Homes y Ryan 1971, Matsuda y Yoneda 1974, Count, et.al. 1982. (1)

La toxina es una molécula proteica con un peso molecular entre 140,000 y 160,000 daltones. El modelo estructural propuesto por Bizzini, et. al. 1969, considera a la molécula compuesta por dos subunidades entre las que existen uniones no covalentes. Cada subunidad o monómero está formado por dos cadenas polipeptídicas, una mayor con peso molecular de 52,000 y una menor o ligera con peso de 21,000 daltones; unidas por puentes disulfuro. Fig. 1a (6).

Otro modelo, propuesto por Matsuda y Yoneda, señala que la toxina está constituida por dos cadenas polipeptídicas con peso de 107 y 53,000 daltones respectivamente, unidas por enlaces disulfuro. Estos autores indican que la toxicidad de la molécula se encuentra en la cadena pesada. Fig. 1b (7).

Estos autores en 1975 extendieron estos hallazgos, encontrando que la toxina tetánica es elaborada intracelularmente por la bacteria como una sola cadena polipeptídica, que es secretada al medio de cultivo, y por medio de una enzima pasa a la forma extracelular de doble cadena.

Analizando la composición polipeptídica de la toxina intracelular se encontró que el grupo aminoterminal de la cadena pertenece a prolina mientras que, en la toxina extracelular el grupo amino terminal de la cadena ligera es prolina y en la pesada dicho grupo procede de leucina. Por lo que se propone que una enzima proteolítica de Clostridium tetani está involucrada en esta alteración de la estructura de la molécula.

Torsten, et. al. 1979, propone que existe una asociación

cerrada entre la formación de esta enzima y la toxina tetánica producidas - en los cultivos por Ci. tetani; de este modo estos autores han sugerido - que la toxina es secretada en el medio de cultivo como una sola cadena polipeptídica que se hidroliza posteriormente por proteasas extracelulares dando como resultado la estructura de doble cadena. Fig. 2 (8).

Recientemente se sugiere que la producción de la toxina por el bacilo, está bajo el control de un plásmido, ya que su pérdida provoca - eliminación de la toxigenicidad. Laird, et.al. 1980 (1).

La toxina puede extraerse de la bacteria, con una solución hipertónica neutra (Raynaud 1974) sin embargo, generalmente el cultivo se mantiene el tiempo suficiente para que se lleve a cabo la autólisis celular y con esto se libere espontáneamente en el medio de cultivo, y se pueda separar de los detritus celulares por filtración o centrifugación. En solución acuosa la toxina es muy inestable al calor y la luz, por lo que debe guardarse en lugar frío y oscuro. Puede precipitarse con sulfato de amonio y liofilizada conserva su potencia por mucho tiempo. (1)

La toxina tetánica es uno de los venenos más potentes que se conocen; su toxicidad excede con mucho la de los alcaloides y otras - sustancias que suelen considerarse altamente venenosas. Las preparaciones cristalinas contienen de 5 a 7.5×10^7 dosis letales (DL) para el ratón por mg de nitrógeno; por lo general se presenta un período de incubación entre la inoculación y la aparición de síntomas, siendo como mínimo ocho - horas, más allá de ese punto, el período de incubación es inversamente - proporcional a la cantidad de toxina inyectada (2).

Patogenia.

El mecanismo de patogénesis del bacilo, está dado por la - producción de la toxina en el sitio de la infección y su posterior diseminación en el organismo, dando lugar al complejo sintomático característico de la enfermedad.

La toxina se fija en el sistema nervioso en los gangliónicos

que son lípidos formados por: ceramidas, hexosas, N-acetil-galactosamina y ácido siálico (éste último componente los distingue de los cerebrósidos). La fijación de la toxina depende del número y posición de los residuos de ácido siálico. (10).

La toxina tetánica tiene un efecto periférico sobre los músculos con inervación parasimpática colinérgica y sobre los músculos esque-léticos, bloquea la transmisión neuromuscular e interfiere con el mecanismo de relajación muscular. A nivel clínico puede explicar parte de las obser-vaciones de Kerr en el sentido de una hiperactividad del sistema simpáti-co. (11).

La toxina se absorbe al nivel de la unión neuromuscular y es transportada centrípetamente en los axones, el mecanismo de acción es triba en la desaparición del efecto inhibitorio que se ejerce posináptica -- mente, al efectuarse el proceso inhibitorio de las neuronas motoras y de -- las intermedias, se tiene una exaltación de los reflejos polisinápticos al -- tiempo que los reflejos monosinápticos no se alteran. Las neuronas inter-medias desinhibidas envían impulsos a todos los sectores de la médula espi-nal y aún a estructuras nerviosas supraespinales, con lo que se tiene el estado de "estación con despacho universal", que conduce a la aparición de las convulsiones generalizadas.

No está definida la causa de la muerte en el tétanos, puede ser el resultado de alteraciones metabólicas que se reflejan parcialmente en las elevaciones séricas de las enzimas musculares tales como la Creatinfos-focinasa, la Deshidrogenasa láctica y la Deshidrogenasa alfa-hidroxi-butfri-ca; algunos de esos cambios pueden ser consecuencia de la hiperactividad muscular durante el tétanos así como de la acidosis terminal.

Las dos manifestaciones clínicas del tétanos son la rigidez y los espasmos musculares. La rigidez se presenta primero en los masete-ros (trismus), siguen los músculos abdominales y en los de los canales -- vertebrales, particularmente en los extensores (opistotonos). Los espas-mos musculares muestran fluctuaciones y varían según la severidad del -- cuadro clínico, afectan principalmente los músculos faciales y producen la risa sardónica, en caso de generalizarse llevan al desarrollo de convulsio-

nes. En los recién nacidos son frecuentes los espasmos de los músculos respiratorios que producen paros. (9).

Toxoide tetánico.

La producción antitoxina tetánica se realiza desde que Von Behring y Kitasato demostraron que el suero de animales inmunizados con toxina tetánica modificada con tricloruro de iodo, neutralizaba la toxina, - protegiendo así a animales inoculados con toxina o con el bacilo mismo. -- Behring en 1898 obtuvo grandes cantidades de antitoxina al inmunizar borregos y caballos y no fue sino hasta 1914 en que se inició la administración de antisueros en humanos, logrando disminuir la mortalidad; posteriormente Vallé y Bazy (1917), llevaron a cabo la vacunación de los heridos - durante la primera guerra mundial con toxina destoxificada con tricloruro de iodo, posteriormente en el año de 1921 Buxtón y Glenny iniciaron la producción sistemática de antitoxina a gran escala. (2).

Los productos utilizados para la inmunización activa fueron desplazados en 1923 cuando Ramón descubre que la toxina expuesta a cierta concentración de formaldehído pierde su capacidad tóxica conservando - su poder inmunogénico, este producto llamado toxoide comienza a utilizarse como vacuna en humanos en 1930 (1).

En nuestro país, se inicia la vacunación con amplia cobertura hasta 1953, vacunándose en un período de 20 años más de 62 millones de personas, Tabla II, sin contemplar las primeras dosis aplicadas a personas con esquemas de inmunización incompletos. (5).

A partir de los años 50's los toxoides fueron producidos por destoxificación con formaldehído de los filtrados crudos del cultivo. En la actualidad el toxoide crudo no se usa para la vacunación en humanos, algunas veces se utiliza en la inmunización animal, particularmente en la primera inmunización, en la producción de sueros heterólogos anti-tetánicos. (2).

VACUNA ANTITETANICA

La producción de la vacuna se realiza actualmente siguiendo el manual de procedimientos editado por la Organización Mundial de la Salud (1977).

Utilizándose una cepa de Clostridium tetani toxigénica que se coloca en un fermentador durante una semana aproximadamente, el cultivo se filtra obteniéndose del mismo la toxina; se destoxifica mediante la adición de formaldehído al 40% para tener una concentración final de 0.5%, se incuba a 37°C por cuatro semanas, obteniéndose de esta manera el toxoide crudo, el cual se concentra por ultrafiltración.

Este concentrado de toxoide crudo, es semipurificado por fraccionamiento con sulfato de amonio, recuperándose del 60 al 70%.

Las preparaciones del toxoide están sujetas a las siguientes normas:

Se empleará como denominación común la equivalente de la internacional Vaccinum tetani, en el idioma del país de origen.

Definición descriptiva. Se entiende por Vaccinum tetani una preparación de toxoide tetánico obtenido de la toxina tratada con formaldehído.

Actualmente se acepta que la actividad del toxoide tetánico se puede evaluar, mediante una prueba activa de provocación en cobayos o ratones, en los que se inocular el toxoide tetánico junto con una dosis - de provocación letal o dosis paralizante, los resultados de la vacuna en - ensayo se comparan con la de una preparación de referencia.

Anteriormente el nivel de potencia de la vacuna antitetánica se expresaba en unidades de floculación Lf. Sin embargo desde el establecimiento de las últimas normas en 1914 debe especificarse el grado mínimo aceptable de actividad, expresándolo en Unidades Internacionales (UI). Además se ha comprobado que este segundo patrón internacional

tiene una relación in vivo in vitro de 1.4/1.0 utilizándose para la prueba de floculación, partiendo de que cada vial contiene 1000 equivalentes Lf.

La antitoxina tetánica se conserva en ampollas que contienen suero equino-hiperinmune desecado, a razón de 1400 UI por vial.

Por otra parte en 1965, resultó necesario el Patrón Internacional para el toxoide tetánico (Adsorbido), debido a que la relación dosis-respuesta de los productos adsorbidos no es equivalente a la de los productos solubles (no adsorbidos). La preparación de una anatoxina tetánica adsorbida en hidróxido de aluminio y que contiene como mínimo 250 UI por vial, debe contener de 5 a 30 Lfs o 75 UI por dosis humana.

En estas normas se ha incluido una prueba de estabilidad, en vista de la necesidad de garantizar que las vacunas sometidas a una temperatura ambiente elevada, siguen conservando su actividad. Aunque hay muy pocos datos para establecer una correlación entre el grado de actividad en una valoración biológica y la protección conferida al hombre, y todavía menos para correlacionar el grado de actividad con la duración de la inmunidad.

PRUEBAS REQUERIDAS PARA LA ELABORACION DE LA VACUNA ANTITETANICA

Las pruebas disponibles que bastan para fijar un mínimo de actividad son las siguientes:

Prueba de esterilidad. Cada lote de toxoide a granel se someterá a pruebas de esterilidad bacteriana.

Prueba de toxicidad específica. Se verificará la ausencia de toxina tetánica por inyección a 5 cobayos por lo menos, cada uno de los cuales deberá pesar de 250 a 350 g., cada cobayo recibirá por vía subcutánea una cantidad equivalente a 5 dosis individuales humanas como mínimo, los animales que mueran serán sometidos a un examen necrópsico. Se considerará que el producto acabado a granel es satisfactorio si ningún cobayo presenta síntomas de parálisis u otros signos de tétanos en

los 21 días siguientes a la inyección y si al menos el 80% de los animales sobreviven al cabo del período de prueba.

Prueba de pureza antigénica. Se comprobará determinando el valor Lf y la concentración de nitrógeno protelco (no dializable). La de terminación del valor Lf se hará de acuerdo con la técnica de Ramón, con trastando con el segundo patrón internacional de la antitoxina tetánica o una preparación de referencia equivalente, que haya sido aprobada por el servicio nacional de inspección. Se considera que el toxoide tetánico es satisfactorio si contiene por lo menos 1000 Lf por mg de nitrógeno proteínico no dializable.

Ágentes conservadores. Al producto acabado se le añadirá un agente conservador adecuado el que previamente se habrá comprobado de no ejercer ningún efecto perjudicial sobre el toxoide tetánico ni sobre otros componentes vacunales, con los que ésta puede estar combinada y sobre todo que no provoque reacciones nocivas en el hombre.

Coadyuvantes. El coadyuvante utilizado, deberá estar -- aprobado por el servicio nacional de inspección (pureza y concentración).

Como sustratos minerales deben emplearse compuestos de aluminio o de calcio. La concentración de aluminio no deberá exceder de 1.25 mg y la de calcio de 1.3 mg por dosis individual humana. En algunos países se precipita el adsorbente en presencia del toxoide para mejorar la adsorción y aumentar la estabilidad.

Prueba de actividad. La actividad inmunizante de cada lote de producto acabado a granel, se comprobará por comparación con material nacional de referencia, contrastando con el patrón internacional -- apropiado. La prueba consistirá en inocular grupos de cobayos (250-350 g) o de ratones de (14-20 g, siempre que en una misma prueba los pesos de los ratones no varíen en más de 3 g), utilizando tres diluciones - del producto acabado a granel y del material de referencia. Después de la inmunización, los animales serán sometidos a una prueba de provocación con una dosis letal o paralizante de toxina administrada por vía subcutánea. Para calcular la actividad del producto acabado a granel se utilizarán métodos estadísticos estandarizados. El método adoptado y su interpretación --

tendrán que estar aprobados por el servicio nacional de inspección.

La actividad de la vacuna antitetánica que contenga un coadyuvante no podrá ser inferior a 40 U.I. por dosis individual humana. El material de referencia que se utilice a esos efectos tendrá que estar -- contrastando con el patrón internacional del toxoide tetánico adsorbido.

Prueba de residuo de formaldehído libre. La presencia de formaldehído libre, no deberá pasar de 0.2 g/l.

Prueba de estabilidad. La estabilidad durante el almacenamiento se verificará por lo menos en tres tandas consecutivas del producto acabado a granel. Siempre que se introduzca algún cambio en el procedimiento de producción, habrá que demostrar que la vacuna preparada por el método modificado es estable.

La vacuna deberá satisfacer las normas de actividad en la fecha de caducidad establecida, siempre que haya estado almacenada a la temperatura recomendada.

pH. Deberá registrarse en el producto acabado a granel siendo éste entre 6.0 y 6.7.

Prueba de inocuidad. En el lote final se comprobará la toxicidad inyectando por vía intraperitoneal, una dosis humana, pero no más de 1 ml, a cada miembro de un grupo de cinco ratones (17-22 g) y por lo menos una dosis humana (no más de 5 ml), a cada miembro de una pareja de cobayos (250-350g). Las pruebas deberán estar aprobadas por el servicio nacional de inspección. El producto final se considerará inocuo si los animales sobreviven por lo menos siete días sin presentar síntomas significativos de toxicidad.

Inspección de los envases definitivos. Todos los envases de cada lote final serán objeto de una inspección visual, y los que presenten anomalías, como conglomerados o partículas serán desechados. (12).

Aunque el toxoide que se fabrica actualmente en México -- presenta adecuada capacidad inmunogénica (13, 14, 15), provoca en algunos individuos, reacciones secundarias en el sitio de su inyección como son

dolor local y edema, y pueden imposibilitar el trabajo durante días. (9).

Así también puede provocar reacciones de tipo general consistentes en fiebre, vómitos, postración, etc., las cuales se deben en parte a las impurezas presentes en el toxoide. (16).

Es por lo tanto, de gran importancia el disminuir al máximo las impurezas presentes en el toxoide, para eliminar las reacciones secundarias y favorecer un aumento en su capacidad inmunogénica, al disminuirse la competencia entre los antígenos de la mezcla.

COMPETENCIA ANTIGENICA

Es el nombre que se dá al fenómeno en el que la inyección de un antígeno puede inhibir la respuesta inmunológica simultánea a otro - antígeno, con el que no tiene ninguna relación inmunológica; este fenómeno es mediado de alguna manera por los linfocitos T. El mecanismo no está - claro, pero la competencia es de la mayor importancia en los programas de vacunación, en los que se suministra más de un antígeno al mismo tiempo. (17)

En general se presentan tres tipos de competencia: Intramolecular, Intermolecular cuando se usa una mezcla de antígenos, e Intermolecular con antígenos administrados secuencialmente.

Competencia Intramolecular:

Se lleva a cabo este tipo de competencia, si los antígenos involucrados presentan epitopes diferentes; durante la inducción de la respuesta inmune las células son seleccionadas por el antígeno el cual es reconocido por los receptores encontrados en la célula B, los que son idénticos al anticuerpo secretado por la misma y/o por los receptores en la célula T, específicos para el epitope y un Ag de histocompatibilidad clase II. Por lo tanto debe existir un orden en el cual las células sean capaces de unirse a un antígeno en particular y cuando el antígeno es procesado, se presenta un fenómeno de presión selectiva, la cual es mucho más grande cuanto

más baja es la concentración del mismo. Como resultado, para cada determinante antigénico se presentará una competencia entre células sensibles en el cual los receptores tienen un acceso mayor, sobre todo cuando el suministro antigénico es limitado.

La teoría de la selección clonal por el antígeno explica la maduración de la respuesta inmune (incremento de la afinidad del anticuerpo con el tiempo), los efectos de dosis del antígeno sobre la cantidad y afinidad del anticuerpo producido, la baja afinidad del anticuerpo cuando se produce un estado de tolerancia parcial, y la supresión de la producción de anticuerpos o la selección de anticuerpos de alta afinidad con la administración pasiva de estos.

Si se tiene en mente que un antígeno posee epitopes diferentes los cuales serán reconocidos por un número equivalente de poblaciones celulares sensibles al antígeno y si alguna de estas poblaciones se encuentra en mayor número, o si tienen mayor afinidad para el antígeno, éstas se unirán a ellos preferencialmente. Como resultado la producción de anticuerpos contra ciertos determinantes en un complejo antigénico, predominará a expensas de la producción de anticuerpos contra otros.

La dominancia de ciertos determinantes en una competencia intramolecular es por lo tanto el resultado de un número mayor de células que comparten receptores para aquellos, o su mayor afinidad comparada con el número y afinidad de las células que tienen receptores para otros determinantes antigénicos de la misma molécula.

Deben existir razones diferentes de la presencia de precursores disponibles, para algunas regiones de una molécula que para otras, — por ejemplo: algunas áreas inmunopotentes pueden ser antigénicamente más complejas que otras, el control genético de la capacidad para responder — limitará específicamente el número de precursores disponibles para ciertos determinantes. De este modo no hay contradicción para la teoría de la selección clonal, que postula una distribución aleatoria de células sensibles a los antígenos, originadas por procesos de mutación somática. (18).

Las predicciones de esta hipótesis incluyen:

a) La competencia intramolecular está en función de la -- dosis del antígeno siendo más evidente a bajas concentraciones. La compe tencia depende de la proporción de células sensibles al antígeno.

b) Cuando se lleva a cabo esta competencia es posible de-- mostrar diferencias en el número de células disponibles para los distintos deter minantes antigénicos, ya sea por medio de las técnicas de dilución li mitante o de acuerdo a la afinidad del anticuerpo sintetizado para cada de terminante por separado.

c) Si las poblaciones celulares que reconocen ciertos deter minantes se han amplificado en una primera inmunización, la respuesta se-- cundaria será en muchos casos dominante, y se suprimirá la respuesta a - otros epitopes en la misma molécula. Una respuesta secundaria por lo tan to, será más efectiva en la competencia que una primaria.

d) En la medida en que la tolerancia y la administración - pasiva de anticuerpos dificulte el reconocimiento a deter minantes específi-- cos, se provocará también la prevención del efecto competitivo de deter minantes dominantes.

Se esperaría entonces que la administración pasiva de anti cuerpos ocasione tanto un efecto supresor como un efecto favorecedor pa-- ra la producción de anticuerpos.

Es posible predecir el papel de diferentes tipos celulares - en la competencia intramolecular de acuerdo a consideraciones teóricas. Pa-- ra los antígenos timo-dependientes, se asume por razón de simplicidad que todos los determinantes son igualmente capaces de cooperar con otros en - la misma molécula, y que el procesamiento del antígeno permitirá la presen tación de todos los determinantes a las células T. Si esto es correcto cu ando ocurre la competencia entre células T, puede no provocar una estimula-- ción preferencial de células para algún epítopo en particular. (18).

Los tipos de células involucradas en la competencia intramo-- lecular, deben ser por lo tanto células precursoras de células formadoras - de anticuerpos o células B. Una posibilidad es que la competencia entre --

las poblaciones de la célula B, se lleva a cabo después de que el antígeno se ha localizado en la superficie de la célula T, células dendríticas o macrófagos (Mitchison et. al. 1970; Nossal y Ada 1971 en Antigenic competition).

El requerimiento para la localización del antígeno y su presentación puede en esta forma contribuir a la limitación de la fuente de antígeno.

Competencia Intermolecular.

Se presenta entre los epitotes de moléculas diferentes cuando se administra simultáneamente una mezcla de antígenos.

Para la competencia intermolecular, se necesitan diferentes moléculas o partículas presentando muchas variaciones y a veces interviene la casualidad. En esta competencia pueden presentarse varios factores suprimiendo la respuesta como son la tolerancia a los antígenos dominantes, o la liberación de agentes inhibidores no específicos los cuales pueden suprimir la respuesta a otros antígenos.

Se sugieren dos modelos:

En el primero se propone un mecanismo de presentación común principalmente a través de la superficie de células dendríticas reticulares de los folículos de ganglios linfáticos y bazo. Fue descrito por Taussing y Lachman (1972), y en él se asume que el antígeno se localiza en un sitio X por medio de un anticuerpo cooperador (también llamado IgX) dirigido contra determinantes específicos.

Este modelo propone el reconocimiento inicial del antígeno -- por la célula T, resultando en la liberación de IgX el cual está unido a la membrana de la célula dendrítica y de esta manera se presenta el antígeno a la célula B específica. Si el número de sitios de unión de la molécula de -- IgX es limitado, una competencia por estos sitios ocurrirá entre los anticueros por cooperadores dirigidos hacia diferentes antígenos. (18).

Una variación de este modelo puede por lo tanto ser suger-

rida, la cual retiene las propiedades semiespecíficas de la molécula del IgX como un inhibidor. Se propone que después de la liberación por la célula T, la molécula IgX se unirá no a la célula dendrítica sino directamente a la célula B, a través de receptores para la porción Fc.

Cada uno de estos modelos sugiere una competencia por anticuerpos cooperadores de naturaleza, aunque especulativo explica adecuadamente dos de las claves características de este tipo de competencia:

i) una dependencia en las cantidades relativas del antígeno involucrado e ii) independencia en la producción de anticuerpos a un antígeno dominante.

Ambos modelos hacen la predicción de que la competencia intermolecular no afectará la respuesta de los antígenos T-independientes — de tal manera que los antígenos pueden ser capaces de estimular las células T y esto viene a ser dominante por si mismo en situaciones competitivas. Se hace notar que ambos modelos acomodan fácilmente la competencia intramolecular en células B en la sección anteriormente citada. (14).

Competencia Intermolecular con antígenos administrados secuencialmente.

Se presenta cuando se proporciona antígeno a un cierto — tiempo posterior a otro estímulo antigénico diferente. Cuando dos antígenos son inyectados en secuencia, se ha encontrado que la respuesta dada al segundo antígeno puede ser suprimida.

El tiempo que transcurre entre la administración secuencial de los antígenos, es importante para encontrar la máxima competencia dependiente del grado de supresión producida.

También se deben tomar en cuenta la inmunogenicidad y la dosis del antígeno involucrado. En general el antígeno más inmunogénico — es administrado primero y en alta dosis para producir un efecto profundo de supresión por competencia, la cual va a ocurrir más rápidamente.

La respuesta a un inmunógeno pobre, o a pequeñas dosis

es más fácilmente suprimida, por una competencia secuencial que por un -- buen inmunógeno o una alta dosis.

Muchos de los efectos encontrados cuando los antígenos son administrados en secuencia pueden ser explicados por la hipótesis que postula una producción de inhibidores, no específicos de la respuesta inmune. Por lo tanto se asume lo siguiente:

i) el primer antígeno administrado en una secuencia generalmente se comporta como el antígeno dominante, y suprime la respuesta para otros antígenos que son administrados en los siguientes diez días.

ii) el tiempo durante el cual la competencia se lleva a cabo no siempre se relaciona con el máximo de la respuesta inmune para el primer antígeno.

iii) un estímulo secundario generalmente tiene un efecto más - marcado que la dosis primaria.

iv) en general no es necesario inyectar los antígenos en el - mismo sitio.

v) se ha demostrado la participación de la célula T en una competencia secuencial (Gershon y Kondo, 1971).

vi) la competencia secuencial puede abolirse por los anticuerpos contra el antígeno dominante, siendo la cantidad de anticuerpos requeridos para inhibir la competencia mayor que la necesaria para la supresión de la producción de anticuerpos específicos. La hipótesis que se sugiere para explicar la competencia secuencial es que las células que son estimuladas liberan factores que son inhibitorios para la estimulación y división de las células T. Por lo que se sugiere que estos inhibidores funcionen como reguladores en la proliferación celular de la respuesta inmune.

Estos incrementan el control por retroalimentación que ejercen los anticuerpos, a pesar de la secreción específica de las células T de inhibidores o supresores que actuarían tanto en las células T como

en las B; cuando un segundo antígeno es inyectado un cierto tiempo después del primer antígeno, este llega a un medio ambiente inhibitorio por lo que - el resultado es una supresión de la respuesta inmune.

Esta hipótesis presenta un fenómeno especulativo para generalizar e involucra muchos antígenos no relacionados. Los antígenos que son involucrados en una competencia secuencial no necesariamente compiten cuando se administran juntos, sin embargo se puede esperar una inhibición mutua en algunos casos. En una respuesta secundaria se puede presentar una competencia más efectiva. Los inhibidores responsables en una competencia secuencial son totalmente inespecíficos, en estos términos la respuesta para un mismo antígeno administrado en un segundo tiempo muy corto teóricamente - debería ser inhibido.

Aspectos prácticos de la competencia.

Las investigaciones de Barr y Llewellyn-Jones 1953, 1955; - muestran los factores que deben ser considerados cuando se administran vacunas y toxoides en secuencia o en mezclas:

i) cuando se realizan inoculaciones de diferentes vacunas o toxoides, siendo administrados en una serie, es importante dejar un intervalo entre las inoculaciones de 30 días para eliminar toda posibilidad de una competencia secuencial.

ii) con el propósito de disminuir el número de inyecciones en un programa de vacunación, es usual administrar mezclas conocidas en combinación profiláctica. Probablemente la más conocida es la vacuna triple (difteria, tosferina y tétanos).

En estas mezclas es necesario balancear adecuadamente todos los componentes para obtener un óptimo de inmunización contra todos los antígenos y de esta manera poder eliminar la supresión de la respuesta para -- algún componente por competencia intermolecular. (18).

En el caso de que exista una pre-inmunidad se puede espe-

rar este tipo de competencia igual para todos los componentes de la mezcla y también que la respuesta secundaria para algunos componentes puede inhibir la respuesta primaria para otros, de esta manera se hace notar que - en el curso de una infección se puede observar los mismos fenómenos de estimulación o supresión para ciertos epitopes. (18).

Raynaud. M. Bizzini, et.al., Turpin A. 1971, llevaron a - cabo un trabajo sobre la heterogeneidad del toxoide tetánico, obtuvieron -- tres diferentes preparaciones de toxoide a partir de una toxina pura, una parcialmente purificada y una toxina cruda (toxina del filtrado). La des--toxificación la realizaron adicionando formaldehído incubando a 37 °C por - 15 días.

En cada caso se obtuvo una población molecular heterogé--nea dentro de la cual se encuentra el toxoide que se presenta en varios estados de agregación.

Utilizando el proceso de filtración en gel con Sepharosa 4B obtuvieron tres fracciones.

- 1.- Formas muy "fuertemente" agregadas (toxoides polimérico pesado).
- 2.- Formas intermedias (toxoides oligomérico)
- 3.- Formas monoméricas (toxoides 7S)

En la destoxificación de las tres toxinas; puras, crudas y semipuras se observó una pequeña cantidad de formas pesadas, las formas oligoméricas se obtienen en diferentes proporciones. La forma monomérica toxoide 7S se obtuvo en gran cantidad de los toxoides obtenidos de la toxina pura y cruda. Este toxoide 7S presenta una alta actividad específica - muy parecida a las características moleculares de la toxina pura. (19).

Estos mismos autores en 1971, probaron la inmunogenicidad de estos tres toxoides con diferentes grados de polimerización, utilizando - los antígenos solubles y adsorbidos en CaCl_2 , encontrando que el toxoide - en la forma monomérica 7S aislado de una toxina pura, presentó la más alta actividad inmunogénica, concluyendo que la inmunogenicidad del toxoide se incrementa paralelamente con el grado de pureza de estos. (20).

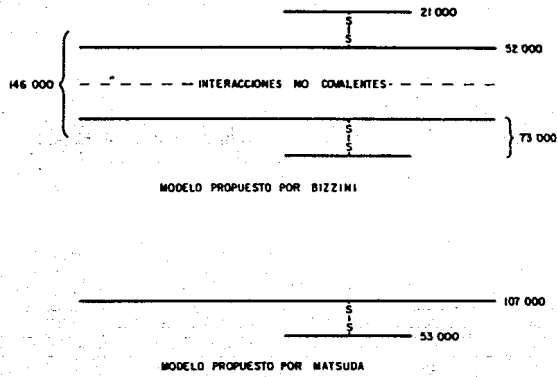


Fig. 1. Modelos estructurales de toxina tetánica propuestos por Bizzini et. al. (1a) y Matsuda y Yoneda (1b).

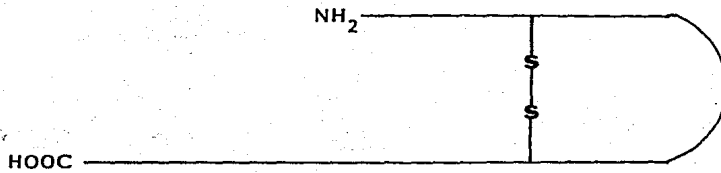


Fig. 2. Modelo Estructural de la Toxina tetánica Intracelular propuesto por Crave-Davson.

TABLA I

MORTALIDAD POR TETANOS * ESTADOS UNIDOS MEXICANOS †

(Grupos de Edad por Años)

<u>AÑOS</u>	<u>< 1</u>	<u>1-4</u>	<u>5-14</u>	<u>15-24</u>	<u>25-34</u>	<u>35-44</u>	<u>45-54</u>	<u>55-65</u>	<u>65-74</u>	<u>> 75</u>	<u>CASOS TOTALES</u>
1961	100.4	2.2	2.3	2.0	2.6	3.2	4.1	6.1	6.2	7.4	2,635
1962	90.3	1.5	2.4	2.2	2.7	3.6	3.6	7.0	6.1	6.1	2,477
1963	79.5	2.3	2.1	1.7	2.3	3.4	3.4	4.7	6.3	8.3	2,340
1964	76.8	1.9	1.9	1.5	2.6	3.1	2.9	6.1	5.8	6.9	2,361
1965	68.1	1.5	1.4	1.2	1.7	3.2	3.7	4.4	4.8	9.5	2,121
1966	69.7	1.5	1.3	1.3	1.8	2.7	3.2	4.7	6.7	8.0	2,213
1967	62.5	1.7	1.3	1.1	1.9	2.8	3.1	4.1	4.6	6.7	2,073
1968	59.8	1.6	1.0	1.1	1.8	2.0	2.2	4.4	4.3	7.4	2,031
1969	54.2	1.5	1.1	0.9	1.9	2.2	2.9	4.3	5.4	5.8	1,913
1970	49.6	1.6	0.8	1.0	1.7	2.4	2.6	4.3	4.5	6.0	1,816

* TASA POR 100,000 HABITANTES.

† SALUD PUBLICA DE MEXICO. 3: 335-353, 1977.

TABLA II

INMUNIZACIONES EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS *

<u>AÑOS</u>	<u>DEPT</u> <u>3as. dosis</u>	<u>REACTIVACIONES</u>	<u>TOXOIDE</u> <u>TETANICO</u> <u>2da. dosis</u>	<u>REACTIVACIONES</u>
1955	200,899			
1956	222,128			
1957	188,241			
1959	284,960		176,800 ⁺	
1960	272,824		176,800 ⁺	
1961	346,660		176,800 ⁺	
1962	374,680		176,800 ⁺	
1963	629,880		176,800 ⁺	
1964	409,147		422,135	
1965	642,295		117,600	
1966	803,175	335,199	419,687	342,693
1967	1'115,055	219,782	233,577	79,592
1968	738,688	208,198	382,394	104,132
1969	1'649,632	186,278	154,127	61,005
1970	1'106,348	85,479	60,710	33,400
1971	603,305	110,400	358,897	6,015
1972	639,932	428,604	354,891	74,515
1973	363,431	326,052	800,538	74,115
1974	3'965,932	1'090,609	753,496	150,200
SUMAS	16'374,093	2'990,521	4'942,052	925,667
	<u>X 3</u>		<u>X 2</u>	
	46'122.279		9'884,104	
TOTAL:	62'922,571			

* SALUD PUBLICA MEX. 17 2: 266, 1976.

OBJETIVOS:**GENERALES**

De acuerdo con la hipótesis de que un solo antígeno provocará una respuesta inmune mayor, que cuando se administra junto con una mezcla de proteínas se pretende; eliminar la competencia inmunogénica originada por la presencia de los contaminantes del medio de cultivo, donde se desarrolló Cl. tetani.

PARTICULARES

i) purificación del toxoide tetánico a partir del cultivo de Cl. tetani en dos medios de cultivo distintos.

Medio Müller y Miller

Medio Latham

ii) inmunización de 6 grupos de conejos con el antígeno crudo, semipuro y puro de ambos medios de cultivo.

iii) Valoración de la respuesta inmune de acuerdo al método de IPSEN de los conejos inmunizados.

iv) estudio físicoquímico de los toxoides utilizados empleando técnicas como inmunolectroforesis, y electroforesis en gel de acrilamida para determinar pureza y pesos moleculares.

v) análisis de los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Producción de toxina y toxoide tetánico.

Cepa de Cultivo.

La toxina tetánica se obtuvo del cultivo de Clostridium tetani cepa HARVARD, obtenida de la Organización Mundial de la Salud y proporcionada por el Instituto Nacional de Higiene de la S.S.A.

La cepa se conserva en estado liofilizado, dos días antes de la preparación de la toxina se abre una ampollita con el liofilizado y se pasa a tubos conteniendo medio de caldo tioglicolato, se incuban en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas.

De este cultivo se realiza otro pase a caldo tioglicolato (puede conservarse a -10°C a -20°C durante varias semanas).

No se deben realizar más de 5 pases de la semilla, ya que puede ocasionar pérdida de la toxicidad.

Para comprobar la pureza de la cepa, se siembran placas de gelosa-sangre y tubos de caldo soya tripticasa, se incuban a 37°C - de 48 a 72 horas. En estos medios no debe haber crecimiento bacteriano de ningún tipo.

Para la observación microscópica del cultivo de Cl. tetani, se obtienen frotos teñidos por Gram, en los cuales deben observarse -- exclusivamete bacilos Gram positivos con espora terminal (palillo de -- tambor).

Toxina tetánica.

Para su obtención se utilizaron 2 medios de producción -- distintos: Müeller & Miller y Latham.

MEDIO MUELLER Y MILLERFórmula para 1 litro.

NZ Case	22.5	g
Infusión de Corazón de res	50	ml
Glucosa	11	g
NaCl	2.5	g
Na ₂ HPO ₂ anhidro	2.0	g
KH ₂ PO ₄ anhidro	0.15	g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.15	g
Cistina	0.25	g
Tirosina	0.5	g
Pantotenato de Calcio	1	mg
Uracilo	2.5	g
Tiamina	0.25	mg
Riboflavina	0.25	mg
Piridoxina	0.25	mg
Biotina	2.5	mg
Hierro reducido	0.5	g
Agua destilada	1000	ml

MEDIO LATHAMFórmula para 1 litro .

NZ Case	30	g
Glucosa	8	g
NaCl	2.5	g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	100	mg
Biotina	0.05	µg
Vitamina B ₁₂	250	µg
Tiamina	250	µg
Riboflavina	250	µg
Piridoxina	250	µg
Pantotenato de Calcio	1	mg
Acido Nicotínico	250	µg
Uracilo	1.25	mg
Cistina	1.25	mg
Cloruro Férrico	32	mg
Agua destilada	1000	ml

Se prepararon 60 litros del medio de producción Müller y Miller (M&M) en garrafrones de vidrio con capacidad de 20 l conteniendo 15 l cada uno.

El medio esterilizado se enfrió rápidamente en un baño de agua y se inculó con aproximadamente 150 ml por garrafón de la semilla de Cl. tetani.

Esta semilla se preparó sembrando en matraces Erlenmeyer de 250 ml con el mismo medio de producción, un tubo de Cl. tetani que previamente se descongeló.

Los garrafones se incubaron durante 8 días a 35-36°C, -- manteniéndose en reposo.

Después de este tiempo se pasó el medio de cultivo con la bacteria, a una temperatura de 4°C durante 3 días para aumentar la liberación de la toxina provocado por lisis bacteriana. Al final de la incubación, el cultivo se sometió a las siguientes pruebas:

Prueba de Floculación o determinación de Lfs, de acuerdo con la técnica de Ramón. (21) ver apéndice.

Prueba de Esterilidad. Para esta prueba se tomaron aproximadamente 100 ml de cultivo de cada garrafón, sembrándose en los medios de gelosa-sangre y caldo tripticosa soya, los cuales se leyeron a las 24 horas.

Prueba de Dosis Mortal Mínima. para la determinación de ésta, se tomaron muestras de los cultivos de cada garrafón, centrifugándose a 7,000/g durante 20 minutos, posteriormente se separaron por decantación.

Con el sobrenadante de cada garrafón se prepararon las siguientes diluciones, usando como diluyente una solución de peptona al 1% preparada con NaCl al 0.5 %: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .

Con cada dilución se inocularon dos ratones (18-20 g) - por vía intramuscular con 0.5 ml de cada dilución manteniéndose en observación durante 5 días.

La dosis mínima mortal para el ratón, se expresa como el doble de la inversa de la dilución máxima que contiene la cantidad suficiente de toxina, para matar a los ratones en los primeros 4 días multiplicado por el factor del tiempo en que se registra la muerte y se expresa como DMM/ml. (37).

Destoxificación de la toxina tetánica.

Para destoxificar la toxina se utilizó formol Baker al 38%, agregándose 8 ml por litro de toxina, obteniéndose una concentración final de 3.8 %.

Se agitaron los garrafones y se incubaron a 37°C durante 21 días.

Al cabo de este tiempo se realizó una prueba de seguridad o atoxicidad para comprobar la destoxificación, utilizando 2 cobayos de 250 a 300 g de peso por garrafón, a los cuales se les inyectó intraperitonealmente 5 ml del toxoide sin diluir previamente centrifugado a 7000/g durante 20 minutos.

Se registró el peso inicial y final de cada cobayo observándose durante el período de prueba (21 días) para detectar cualquier síntoma de tétanos.

Filtración del toxoide tetánico.

Una vez comprobada la falta de toxicidad se mezclaron los 4 garrafones y se filtraron mediante prefiltros Millipore AP20, para la eliminación del paquete bacteriano.

Clarificación del toxoide tetánico.

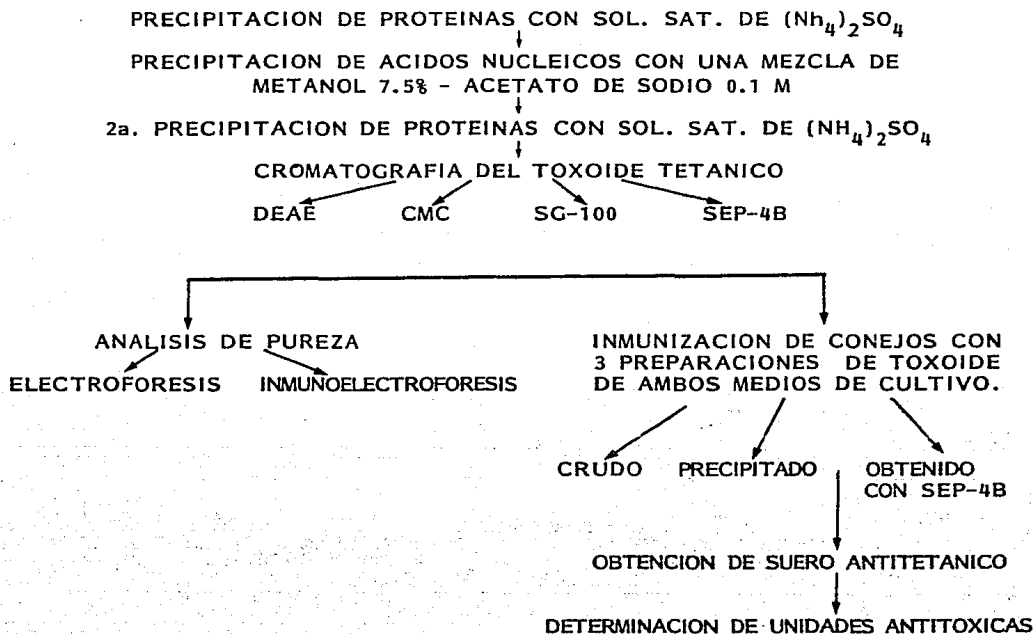
El toxoide se clarificó con prefiltros AP20 y membranas -- 0.8, 0.45 y 0.22 μ de porosidad Millipore, en condiciones no estériles a temperatura ambiente.

Concentración del toxoide tetánico.

Se concentró a 7.4 litros por ultrafiltración durante 6 horas a temperatura ambiente utilizando un cartucho Millipore y se pasó a través de membrana 0.22 μ Millipore, para asegurar la ausencia de partículas en el toxoide.

El toxoide del medio Latham fué proporcionado por el laboratorio de Anaerobios del Instituto Nacional de Higiene, S.S.A.

Los toxoides Müeller y Miller y Latham se purificaron de acuerdo al siguiente esquema:



Precipitación de proteínas por medio de sulfato de amonio.

La precipitación se realizó añadiendo una solución saturada de sulfato de amonio pH 8, volumen a volumen con el toxoide, a 4°C con agitación constante (12 horas) y goteo lento del sulfato. Las proteínas --

precipitadas que incluyen al toxoide, se separaron del sobrenadante por centrifugación a 12,000 x g durante 30 minutos a 4°C.

El precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 Molar pH 7.4 y se colocaron en una bolsa de diálisis, - sumergiéndose en la misma solución amortiguadora, hasta la eliminación del sulfato de amonio.

Precipitación de Acidos Nucleicos .

A el dializado de cada toxoide se le agrega una solución de metanol al 7.5% y acetato de sodio 0.1 M, dejándose reposar durante 48 horas a -15°C; tiempo en el que se forma un precipitado conteniendo los ácidos nucleicos que se eliminan por centrifugación a 12,000 x g durante 30 - minutos a 4°C y posteriormente se realizó la determinación de ácido dextrosí-ribonucleico (22,23), para comprobar su ausencia. ver apéndice.

Segunda precipitación de proteínas por medio de sulfato de amonio.

El sobrenadante obtenido después de la precipitación de -- los ácidos nucleicos, se precipitó con sulfato de amonio solución saturada - pH 7.8 volumen - volumen, con agitación constante a 4°C durante 12 horas, se centrifugaron los toxoides a 12,000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y las proteínas que incluyen al toxoide, se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.8, y se - colocaron en una bolsa de diálisis, (en la misma solución amortiguadora) con cambios sucesivos hasta eliminar el sulfato de amonio, después se realizaron tres cambios de la solución de diálisis con EDTA 0.01 M pH 7.6.

Cromatografía del toxoide tetánico .

Cromatografía de intercambio iónico en columna, del toxoide de M&M (230 mg) se pasaron a través de una columna de 90 cm de altura y 2 cm de diámetro de DEAE-celulosa (Wathman) equilibrada con una solu-

ción de EDTA 0.01 M pH 7.6, colectándose fracciones de 10 ml, se realizó un gradiente discontinuo con NaCl 0.3, 0.5 y 1.0 M; la velocidad de flujo fue de 60 ml/h. Las fracciones obtenidas se leyeron a 280 nm.

230 mg/5ml del toxoide M&M se pasaron a través de una -- columna de Carboximetil-celulosa (Wathman), la cual se equilibró con una -- solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.6, la columna de 90 cm de altura y 2 cm de diámetro, con una velocidad de flujo de 30 ml/h. Se -- colectaron fracciones de 5 ml leyéndose a 280 nm.

Se utilizó una columna de Sephadex G-100-120 (Sigma), de 50 cm de altura y 1.5 cm de diámetro equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.6, con una velocidad de flujo de 10 ml/h; para filtrar 93 mg en 2 ml del toxoide M&M, colectándose fracciones de 1 ml, -- estas se leyeron a 280 nm.

Se combinaron los dos tipos de cromatografía intercambio -- iónico y filtración por pesos moleculares, usando primero Carboximetil-celulosa, concentrando la fracción obtenida y pasando esta por Sephadex G-100-120, se utilizaron 5 ml del toxoide M&M usando amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.6 como solución de corrida, la lectura de las fracciones se realizó a 280 nm.

Finalmente se utilizó Sepharosa 4B-200 (Sigma) que presenta un rango de cromatografía en peso molecular para protefnas de 6×10^4 - 20×10^6 , equilibrada con solución de EDTA 0.01 M pH 7.6. Las dimensiones de la columna fueron de 100 cm de altura y 2.5 de diámetro con una -- velocidad de flujo de 30 ml/h. Se pasó a la columna 230 mg en 5 ml del toxoide tetánico de M&M, se colectaron fracciones de 5 ml, leyéndose las fracciones a 280 nm.

Estos ensayos de purificación del toxoide se realizaron principalmente con el toxoide M&M debido a que se contaba con más volumen de este que del toxoide Latham.

Ensayo de la Pureza

En todas las columnas utilizadas se evaluó la pureza de las fracciones obtenidas, realizando las pruebas de inmunolectroforesis utilizando como antisuero gamas de cerdo antitetánicas obtenidas del suero de cerdos inmunizados con toxoide tetánico crudo. (26, 27, 28), y electroforesis en geles de acrilamida-SDS (30). ver apéndice.

Técnica de Inmunización y Sangrado.

ANIMALES

Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelanda, 6 hembras y 24 machos, con edad de 18-24 meses, y con peso de 3-4 kg, los cuales se separaron en 6 grupos de 5 conejos, todos sin experiencia inmunológica previa con el toxoide tetánico.

ANTIGENO Y ADYUVANTE

Como antígenos se utilizaron las siguientes preparaciones de los toxoides:

- GRUPO 1 Toxoide tetánico crudo M&M
- GRUPO 2 Toxoide tetánico crudo Latham
- GRUPO 3 Toxoide tetánico precipitado con sulfato de amonio M&M
- GRUPO 4 Toxoide tetánico precipitado con sulfato de amonio Latham
- GRUPO 5 Toxoide tetánico (fracción 2) de cromatografía en Sepharosa 4B-200 M&M
- GRUPO 6 Toxoide tetánico (fracción 2) de cromatografía en Sepharosa 4B-200 Latham

Todos los toxoides se estandarizaron a 200 Lf/ml.

Se empleó el Adyuvante completo de Freud (ACF) conteniendo 85 partes de aceite mineral (nujol) con 15 partes de lanolina y 1 mg/ml - de Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv esterilizado y liofilizado (31,32).

Ensayo de la Pureza

En todas las columnas utilizadas se evaluó la pureza de las fracciones obtenidas, realizando las pruebas de inmunolectroforesis utilizando como antisuero gamas de cerdo antitetánicas obtenidas del suero de cerdos inmunizados con toxoide tetánico crudo. (26, 27, 28), y electroforesis en geles de acrilamida-SDS (30). ver apéndice.

Técnica de Inmunización y Sangrado.

ANIMALES

Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelanda, 6 hembras y 24 machos, con edad de 18-24 meses, y con peso de 3-4 kg, los cuales se separaron en 6 grupos de 5 conejos, todos sin experiencia inmunológica previa con el toxoide tetánico.

ANTIGENO Y ADYUVANTE

Como antígenos se utilizaron las siguientes preparaciones de los toxoides:

- GRUPO 1 Toxoide tetánico crudo M&M
- GRUPO 2 Toxoide tetánico crudo Latham
- GRUPO 3 Toxoide tetánico precipitado con sulfato de amonio M&M
- GRUPO 4 Toxoide tetánico precipitado con sulfato de amonio Latham
- GRUPO 5 Toxoide tetánico (fracción 2) de cromatografía en Sepharosa 4B-200 M&M
- GRUPO 6 Toxoide tetánico (fracción 2) de cromatografía en Sepharosa 4B-200 Latham

Todos los toxoides se estandarizaron a 200 Lf/ml.

Se empleó el Adyuvante completo de Freud (ACF) conteniendo 85 partes de aceite mineral (nujol) con 15 partes de lanolina y 1 mg/ml - de Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv esterilizado y liofilizado (31,32).

Inmediatamente antes de la inoculación se realizaron mezclas volumen a volumen del ACF y los toxoides.

INMUNIZACION

Se realizaron 6 inmunizaciones con intervalos de 15 días. En las inmunizaciones primaria y secundaria cada conejo recibió una dosis subcutánea (lomo) de 200 Lf de toxoide mezclado con un volumen igual de adyuvante; en las inmunizaciones siguientes, los conejos recibieron el toxoide tetánico sin adyuvante, inyectándose intramuscularmente en la pata trasera, cada grupo se inmunizó con un preparado diferente. Fig. 3.

SANGRADO

Los conejos se sangraron 8 días después de la 4a, 5a y 6a inmunización por la vena marginal de la oreja, en cantidades aproximadas de 5-10 ml/conejo/sangrado.

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, se desprendió el coágulo y se mantuvo 12 horas a 4°C, posteriormente se eliminó el coágulo, centrifugando a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Los sueros se conservaron a -20°C hasta la determinación del contenido de antitoxina.

Para estudiar la cinética de la respuesta inmune de los conejos, se realizaron inmunoelectroforesis con los sangrados de los grupos 1 al 6 utilizando como antígenos los toxoides tetánicos crudos M&M y Latham.

Determinación de Unidades Antitóxicas.

Los ensayos se realizaron de acuerdo al método de IPSEN (35,36), en ratones de una colonia cerrada de la cepa NIH, con peso de 18 - 20 g sin importar sexo, observándose durante 5 días. ver apéndice.

De acuerdo a la técnica de IPSEN, una unidad antitóxica (UA) es la inversa de la dilución más alta del suero que inhibe completamente 1 L₊ de toxina tetánica.

ESQUEMA DE INMUNIZACION DE CONEJOS PARA
LA PRODUCCION DE ANTITOXINA TETANICA

<u>GRUPO</u>	<u>TOXOIDE</u>	<u>DIA</u>	<u>DOSIS</u>	<u>VIA</u>
1	CRUDO M&M	1	200 Lf/ml+ ACF*	S.C.
2	CRUDO LATHAM	18	200 Lf/ml+ ACF	S.C.
3	PRECIPITADO M&M	34	200 Lf/ml	I.M.
4	PRECIPITADO LAT	49	200 Lf/ml	I.M.
5	S4B-200 M&M	54	200 Lf/ml	I.M.
6	S4B-200 LATHAM	69	200 Lf/ml	I.M.

* ACF = ADYUVANTE COMPLETO DE FREUD.

SC = SUBCUTANEA.

IM = INTRAMUSCULAR.

Fig. 3.

RESULTADOS.

La determinación de unidades de floculación Lf/ml de la toxina tetánica en el medio de Müeller y Miller dió un promedio de 55 ± 5.8 Lf/ml lo cual al igual que los tiempos registrados se anotan en la Tabla III. En ninguno de los 4 garrafones se registró crecimiento bacteriano al sembrar una muestra en gelosa-sangre, caldo tripticasa y soya agar, cultivando en condiciones de aerobiosis, por lo que se demuestra que el medio de cultivo y la semilla de Ci. tetani estaban sin contaminación. Tabla IV.

La determinación de la Dosis Mortal Mínima (DMM/ml) de la toxina tetánica, Tabla V, se realizó para los 4 garrafones de la toxina, obteniendo un valor entre 8.3×10^4 y 17.4×10^5 .

Al término de estas pruebas de control para la toxina, se pasó a destoxificar con el formol (21 días), después de este tiempo se realizó la prueba de Atoxicidad o Seguridad, Tabla VI, en esta determinación los cobayos se observaron diariamente, notándose que no se presentó ningún síntoma de tétanos, como son: dificultad de girar para ponerse de pie, parálisis de las patas traseras o encorvamiento de la columna vertebral, el registro del incremento de peso se conservó dentro de los límites normales de crecimiento en esta cepa de cobayos, comparativamente a los animales testigos, de acuerdo a las diferencias de medias.

Los métodos utilizados para la purificación del toxoide arrojan resultados diversos:

a) la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, proporcionó dos fracciones con densidad óptica muy baja por lo que se utilizó un gradiente salino discontinuo de 0.3, 0.5 y 1. M para poder eluir el material que seguramente estaba fijo a la celulosa, de esta manera se obtuvieron otras dos fracciones con actividad floculante de 600 Lf/ml cada una, Fig. 4, a estas dos fracciones se les llamó A y B.

b) ante los resultados de la cromatografía en DEAE-celulosa, se utilizó Carboximetil celulosa, la cual resultó en la no necesidad de utilizar un gradiente salino, sin embargo solo se obtiene una fracción con actividad floculante de 600 Lf/ml, Fig. 5, a esta fracción se le llamó C.

c) la utilización en Sephadex G-100-120 dió como resultado lo que se muestra en la figura 6, donde se observa nuevamente que no -- existe separación de la mezcla, se obtuvo una fracción a la que se le llamó D, la cual fue obtenida en el volumen de exclusión, lo que sugiere que el peso molecular de estos componentes es alto. Al utilizar el toxoide previamente sometido a intercambio catiónico y posteriormente a Sephadex G-100 120, origina el mismo resultado. Fig. 7. Al utilizar Sepharosa 4B-200, el resultado fue la obtención de dos fracciones de alto peso molecular, de las cuales, la primera constituye una fracción no colorida sin actividad floculante y una segunda fracción colorida con actividad floculante de 800 Lf/ml a la cual se le llamó E. Fig. 8.

La comparación de las diferentes fracciones obtenidas, -- muestra que el producto E, es el que observa mayor actividad específica - (Lfs/ml), por lo que se procedió a realizar la prueba de pureza a través de inmunolectroforesis. Fig. 9, donde se observa que todas las preparaciones muestran varias bandas de precipitación y como dato sobresaliente es el que las primeras fracciones obtenidas en DEAE-celulosa a pesar de no flocular, dan bandas de precipitación, así como la fracción 1 obtenida de la Sepharosa 4B-200.

El análisis de las diferentes muestras sometidas a cromatografía, permite cuantificar la actividad específica a cada muestra, Tabla VII, en la cual se observa que la actividad mayor, la posee la fracción II de el toxoide obtenido por Sepharosa 4B-200.

Las Tablas VIII y IX muestran los datos de actividad específica, de floculación, y cuantificación de proteínas, durante el proceso de purificación de ambos medios de cultivo, se puede observar que realmente basados en la cantidad de Lf en el medio, podemos considerar que se pierde casi el 50% de la proteína en la segunda precipitación con sulfato de -- amonio y el 97% en el fraccionamiento en la columna de Sepharosa 4B-200.

En la figura 10 se muestran las inmunoelectroforesis de -- los diferentes productos obtenidos durante el proceso de purificación utili zando Sepharosa 4B-200. Observe que de la toxina original que muestra 8 arcos de precipitación contra el suero de cerdo inmunizado con toxoide cru do, al final del proceso el toxoide muestra 6 arcos de precipitación.

El análisis de pureza de los diferentes productos obtenidos con las diferentes técnicas empleadas, utilizando un gel de acrilamida al 10% con SDS, muestra que gran parte de los toxoides no penetran en el gel y se observan en todos la presencia de 4 bandas mal definidas con pesos m oleculares arriba de 40,000 daltones. Fig. 11.

Para realizar el estudio de la respuesta inmune al toxoide tetánico, se decidió probar el toxoide tetánico crudo, el cual es utilizado en inmunización de animales para la obtención de suero antitetánico, el to xoide tetánico precipitado con sulfato de amonio que es el que se utiliza -- para la vacunación en humanos, al menos en nuestro país, producido por la S.S.A., y el obtenido con la Sepharosa 4B-200 que al no contar con ge les que nos den un análisis real de la pureza, y tener en el sistema de Inmunoelectroforesis varias bandas de precipitación se decidió llamarlo -- semipuro.

En la figura 12 se observan las inmunoelectroforesis de - los toxoides utilizados para la inmunización de los conejos, se muestran los 6 toxoides, crudo, precipitado y semipuro, tanto el obtenido del me-- dio Müeller y Miller como del Latham, revelados con el suero de cerdos - inmunizados con toxoide crudo.

En la Tabla X, se anotan los datos de concentración de - proteína medidas como nitrógeno (Kjeldhal) para relacionarlo con la acti vidad floculante y la respuesta de los conejos inmunizados con los 3 toxoi -- des diferentes, como se puede observar las Unidades de Floculación eran distintas en el toxoide concentrado, mientras que las preparaciones de to xoide precipitado y el semipuro, llegan a tener una concentración similar de Lf/mgN. Así mismo, la respuesta inmune de los conejos tiende a in-- crementarse de acuerdo al mayor grado de pureza alcanzado en los toxoi -- des semipuros determinado por las Unidades Antitóxicas por ml.

La figura 13 muestra los resultados obtenidos cuando se realiza la Inmunoelectroforesis utilizando como antígenos los toxoides crudos M&M y Latham, y los sueros de los conejos inmunizados con los toxoides crudos, precipitados y semipuros. Se observa que los 6 grupos de animales responden a la estimulación antigénica, sin embargo no hay una diferencia cualitativa, es decir aparentemente en todos los toxoides existen contaminantes que provocan una respuesta copiosa en todos los animales.

TABLA IIIPRUEBA DE FLOCULACION DE RAMON PARA LA
TOXINA TETANICA OBTENIDA DEL CULTIVO M&M

<u>No. garrafón con 15 l de toxina - c/u</u>	<u>Unidades Floculación Lf/ml</u>	<u>Tiempo de Floculación Kf/min</u>
1	50	11
2	60	10
3	60	5
4	50	3
\bar{X}	55 \pm 5.8	

TABLA IVPRUEBA DE ESTERILIDAD PARA LA
TOXINA TETANICA OBTENIDA DEL CULTIVO M&M

<u>No. garrafón con 15 l. de toxina c/u</u>	<u>Medios de Cultivo no Específicos para Cl. tetani.</u> <u>Gelosa-sangre</u> <u>Caldo tripticasa</u> <u>Soya-agar</u>
1	sin crecimiento bacteriano
2	sin crecimiento bacteriano
3	sin crecimiento bacteriano
4	sin crecimiento bacteriano

TABLA V

PRUEBA DOSIS MORTAL MINIMA PARA LA
TOXINA TETANICA OBTENIDA DEL CULTIVO M&M

GARRAFON	DILUCIONES DE TOXINA	2 RATONES/ DILUCION	PERIODO DE OBSERVACION (horas)					
			24	48	72	96	120	144
1	1: 1,000	1	M					
		2	M					
	1: 10,000	3	M					
		4	T	M				
	1: 100,000	5	T	M				
		6	T	M				
	1: 1000,000	7	T	M				
		8	T	T	M			
DMM=17.4x10 ⁵								
2	1: 1,000	1	M					
		2	T	M				
	1: 10,000	3	T	M				
		4	T	M				
	1: 100,000	5	N	T	T	T	T	M
		6	N	T	T	T	T	M
	1: 1000,000	7	N	N	N	N	N	N
		8	N	N	N	N	N	N
DMM=8.3x10 ⁴								
3	1: 1,000	1	T	M				
		2	T	M				
	1: 10,000	3	N	M				
		4	N	M				
	1: 100,000	5	N	T	T	M		
		6	N	T	T	T	T	T
	1: 1000,000	7	N	N	N	N	N	N
		8	N	N	N	N	N	N
DMM=12.1x10 ⁴								
4	1: 1,000	1	M					
		2	T	M				
	1: 10,000	3	T	M				
		4	T	M				
	1: 100,000	5	N	T	M			
		6	N	T	M			
	1: 1000,000	7	N	T	T	T	T	T
		8	N	T	T	T	T	T
DMM=17.4x10 ⁴								
<u>5.3x10⁵ ± 8.05x10⁵</u>								

M=MUERTO
T=TETANIZADO
N=NORMAL.

TABLA VI

PRUEBA DE ATOXICIDAD O SEGURIDAD PARA EL
TOXOIDE TETANICO MyM

<u>GARRAFON</u> <u>DE TOXOIDE</u>	<u>NUMERO</u> <u>DE</u> <u>COBAYO</u>	<u>PERIODO DE PRUEBA</u> <u>Y PESO INICIAL</u> <u>(gr) 1er. DIA</u>	<u>OBSERVACION 21</u> <u>DIAS Y PESO</u> <u>FINAL (gr)</u>	<u>INCREMENTO</u> <u>DE</u> <u>PESO</u>
1	1	262	420	158
	2	267	409.2	142.2
2	1	257	386	129
	2	254	417	163
3	1	275	447	172
	2	254.5	403	148.5
4	1	278.5	466	187.5
	2	297.3	482	184.7
TESTIGO	1	271	453	182
	2	258	421	163

EXPERIMENTALES : (1-4) $D_1 = 43.3$ $D_2 = 96 \frac{D_2}{D_1} = 2.5$

TESTIGO: $D_1 = 13$ $D_2 = 32 \frac{D_2}{D_1} = 2.2$

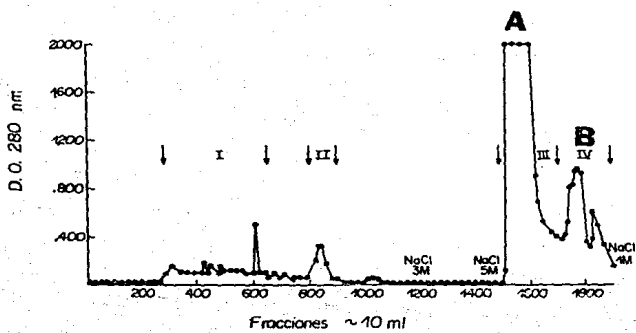


Fig. 4. Cromatografía en DEAE-celulosa del Toxoide Tetánico.

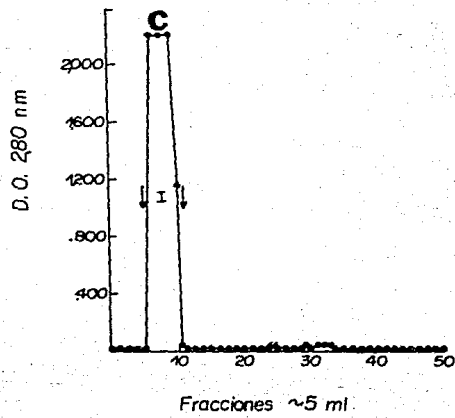


Fig. 5. Cromatografía en CM-celulosa del Toxoide Tetánico.

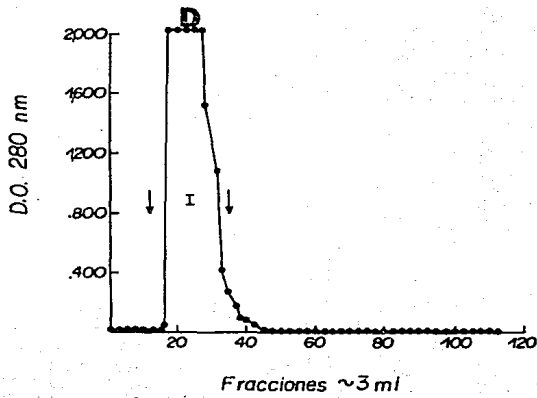


Fig. 6. Cromatografía en Sephadex G-100-120 del Toxóide Tetánico.

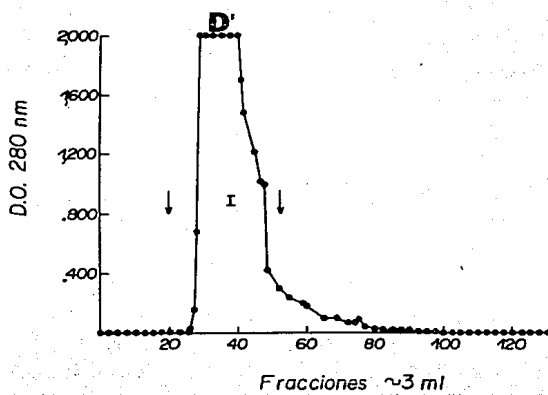


Fig. 7. Cromatografía en CM-celulosa y Sephadex G-100-120 del Toxoide Tetánico.

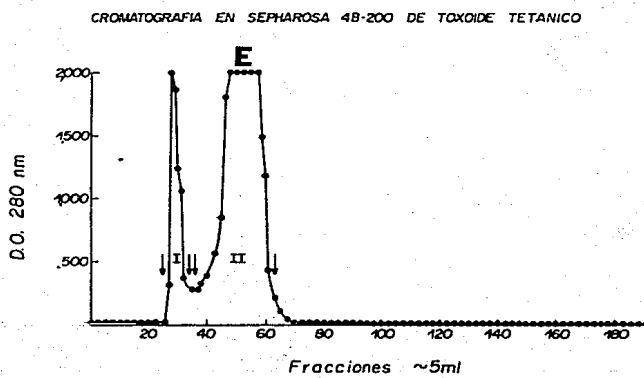


Fig. 8. Cromatografía en Sepharosa 4B-200 del Toxide Tetánico.

INMUNOELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS
EN LOS ENSAYOS DE PURIFICACION DEL TOXOIDE TETANICO M&M

Vs

Igs DE CERDO ANTITETANICAS



Fig. 9.

a) Fracción 1 obtenida con DEAE-celulosa	2 bandas
b) Fracción 2 obtenida con DEAE-celulosa	0 bandas
c) Fracción 3 obtenida con DEAE-celulosa	5 bandas
d) Fracción 4 obtenida con DEAE-celulosa	5 bandas
e) Fracción obtenida con CM-celulosa	5 bandas
f) Fracción obtenida con CM-celulosa y S-G-100-120	6 bandas
g) Fracción 1 obtenida con Sepharosa 4B-200	5 bandas
h) Fracción 2 obtenida con Sepharosa 4B-200	6 bandas

TABLA VII

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PARA LA PURIFICACION DEL TOXOIDE TETANICO M&M

<u>FRACCIONES</u>		<u>CONC.</u> <u>PROTEINA</u> <u>mg/ml</u>	<u>UNIDADES FLOCULACION *</u>	
			<u>Lf/ml</u>	<u>Lf/mg de</u> <u>proteina</u>
TOXOIDE TETANICO PASADO POR DEAE-CELULOSA	Fr. 1	0.7	NF	
	Fr. 2	0.25	NF	
	Fr. 3	53.00	600	11.32
	Fr. 4	70.00	600	8.57
TOXOIDE TETANICO PASADO POR CMC-CELULOSA		70.00	600	8.57
TOXOIDE TETANICO PASADO POR CMC-CELULOSA Y SEPHADEX G 100-120		34.00	600	17.64
TOXOIDE TETANICO PASADO POR S4B-200	Fr. 1	.4	NF	
	Fr. 2	34.00	800	23.58

NF - NO SE OBSERVO FLOCULACION.

* VER APENDICE.

TABLA VIII

RESULTADOS OBTENIDOS DEL TOXOIDE TETANICO
MUELLER Y MILLER EN EL PROCESO DE PURIFICACION

<u>FRACCIONES</u>	<u>CONC.</u> <u>PROTEINA</u> <u>mg/ml</u>	<u>VOL</u> <u>l.</u>	<u>PROT.</u> <u>TOTAL</u> <u>mg</u>	<u>UNIDADES DE FLOCULACION</u>		
				<u>Lf/ml</u>	<u>Lf/mg Prot.</u>	<u>Lf/vol. total</u>
TOXINA TETANICA	7.2	60	432,000	55	7.63	3.3×10^6
TOXOIDE TETANICO SIN CONC.	6.5	60.5	393,250	50	7.69	3.02×10^6
TOXOIDE TETANICO CONCENTRADO	50	7.5	375,000	500	10.00	3.75×10^6
TOXOIDE TETANICO PRECIPITADO CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	6	300,000	700	14.00	4.2×10^6
TOXOIDE TETANICO DESP. DE ELI- MINACION DE ACIDOS NUCLEICOS	46	5.9	271,400	700	15.21	4.13×10^6
TOXOIDE TETANICO 2a. PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	46	.200	9,200	700	15.21	1.4×10^5
TOXOIDE TETANICO FRACCIONADO CON SEPHAROSA 4B-200	34	.100	3,400	800	23.52	8×10^4

TABLA IX

RESULTADOS OBTENIDOS DEL TOXOIDE TETANICO LATHAM EN EL PROCESO DE PURIFICACION

<u>FRACCIONES</u>	<u>CONC.</u>	<u>VOL.</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>UNIDADES DE FLOCULACION</u>		
	<u>PROTEINA</u>		<u>TOTAL</u>	<u>Lf/ml</u>	<u>Lf/mg Prot</u>	<u>Lf/vol. total</u>
	<u>mg/ml</u>	<u>l.</u>	<u>mg</u>			
TOXINA TETANICA	ND	ND	ND	50	ND	ND
TOXOIDE TETANICO SIN CONCENTRACION	ND	ND	ND	50	ND	ND
TOXOIDE TETANICO CONCENTRADO	30	4	200,000	500	10	2 X 10 ⁶
TOXOIDE TETANICO PRECIPITADO (NH ₄) ₂ SO ₄	35	3.5	122,500	500	14.28	1.75 X 10 ⁶
TOXOIDE TETANICO DESPUES DE ELIMINAR ACIDOS NUCLEICOS	36.5	3	109,500	600	16.43	1.8 X 10 ⁶
TOXOIDE TETANICO SEGUNDA PRECIPITACION CON (NH ₄) ₂ SO ₄	24	2	48,000	600	25	1.2 X 10 ⁶
TOXOIDE TETANICO FRACCIONADO CON SEPHAROSA 4B-200	34	.50	1,700	800	23.52	4 X 10 ⁴

ND=NO SE DETERMINO.

INMUNOELECTROFORESIS DE LOS TOXOIDES TETANICOS
DE LAS DIFERENTES PREPARACIONES EN EL PROCESO DE PURIFICACION

Vs

Igs. DE CERDO ANTITETANICAS.

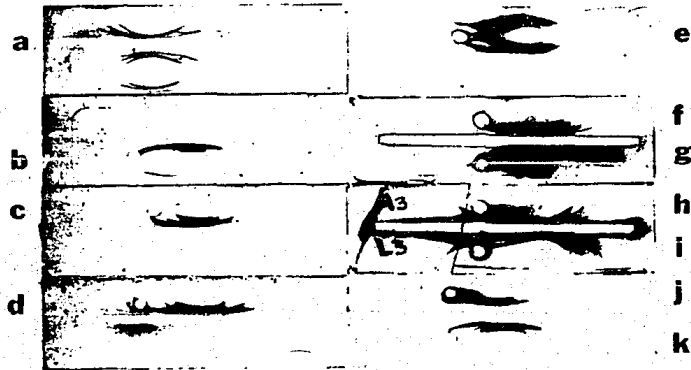


Fig. 10.

Fig. 10. Inmunolectroforesis de la Toxina Tetánica cruda y de los Toxoides Tetánicos en las diferentes preparaciones, en el proceso de purificación.

a) Toxina Tetánica cruda M&M	8 bandas.
b) Toxoide crudo concentrado M&M	6 bandas
c) Toxoide crudo Latham	6 bandas
d) Toxoide precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lat.	6 bandas
e) Toxoide precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ M&M	6 bandas
f) Toxoide después de eliminar Ac. nucleicos M&M	5 bandas
g) Toxoide después de eliminar Ac. nucleicos Lat.	5 bandas
h) Toxoide después de 2da. precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ M&M	5 bandas
i) Toxoide después de 2da. precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lat.	5 bandas
j) Toxoide cromatografiado con S4B-200 fracción 1	5 bandas
k) Toxoide cromatografiado con S4B-200 fracción 2	6 bandas

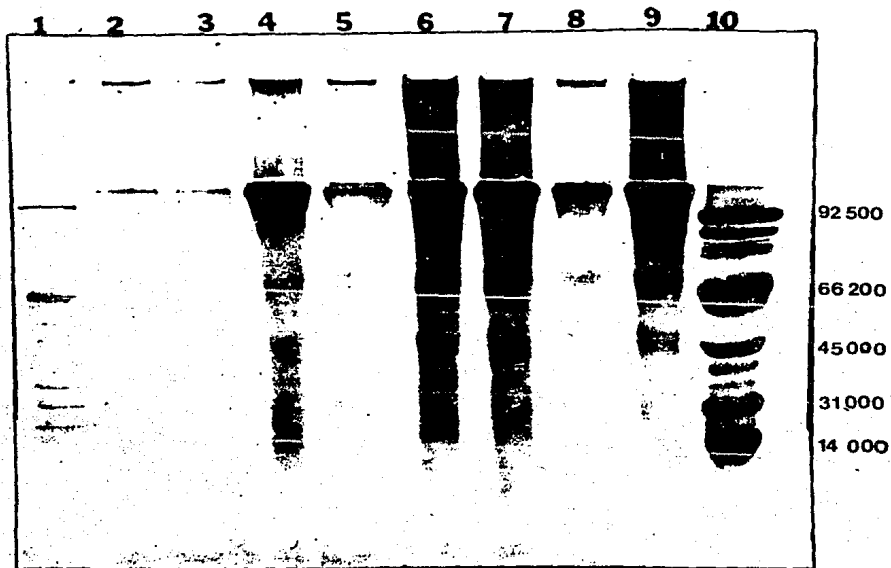
ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA AL 10%

Fig. 11.

Fig. 11. Electroforesis en Gel de acrilamida al 10% con SDS.

- Carril 1 Toxina tetánica M&M con aproximadamente 10 bandas**
- 2 Toxoide tetánico crudo M&M**
- 3 Toxoide tetánico crudo Latham**
- 4 Toxoide tetánico precipitado M&M**
- 5 Toxoide tetánico precipitado Latham**
- 6 Toxoide tetánico M&M pasado por CM-celulosa**
- 7 Toxoide tetánico M&M pasado por Sephadex G-100-120**
- 8 Toxoide tetánico M&M pasado por Sepharosa 4B-200**
- 9 Toxoide tetánico Latham pasado por Sepharosa 4B-200**
- 10 Estándar de pesos moleculares bajos.**

Todos los toxoides a la concentración de 100 µg/ml.

INMUNOELECTROFORESIS DE LOS TOXOIDES TETANICOS
DE AMBOS MEDIOS UTILIZADOS COMO ANTIGENOS

Vs

Igs DE CERDO ANTITETANICAS

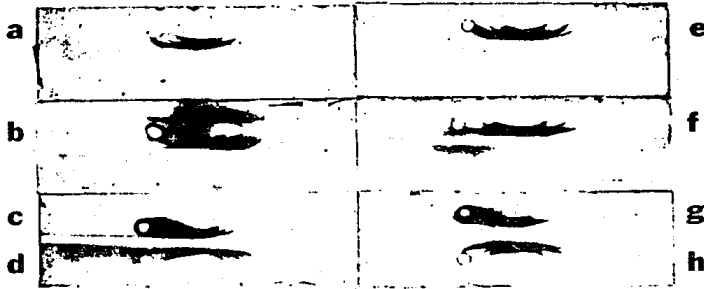


Fig. 12.

- | | |
|--|----------|
| a) Toxoide crudo concentrado M&M | 6 bandas |
| b) Toxoide precipitado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ M&M | 6 bandas |
| c) Toxoide semipuro M&M, fracción 1 | 5 bandas |
| d) Toxoide semipuro M&M, fracción 2 | 6 bandas |
| e) Toxoide crudo concentrado Latham | 7 bandas |
| f) Toxoide precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Latham | 7 bandas |
| g) Toxoide semipuro Latham, fracción 1 | 5 bandas |
| h) Toxoide semipuro Latham, fracción 2 | 6 bandas |

TABLA X

ACTIVIDAD FLOCULANTE DE LOS TOXOIDES Y CONCENTRACION
DE UNIDADES ANTITOXICAS EN EL SUERO DE CONEJOS

<u>INMUNOGENOS</u>	<u>CONC. PROTEINA</u>		<u>UNIDADES FLOCULACION</u>		<u>UNIDADES ANTITOXICAS</u>	
	<u>mgN/ml</u>		<u>Lf/mgN</u>		<u>UA/ml</u>	
	<u>MyM</u>	<u>LAT</u>	<u>MyM</u>	<u>LAT</u>	<u>MyM</u>	<u>LAT</u>
TOXOIDE CRUDO SIN TRATAMIENTO	1.6	0.7	312.5	714.2	246	400
TOXOIDE PRECIPITADO CON $(NH_4)_2SO_4$	0.875	0.63	800	794	340	419
TOXOIDE SEMIPURO	0.733	0.73	1091.4	1095.8	570	423

INMUNOELECTROFORESIS DE
SUEROS DE CONEJOS (6) GRUPOS

Vs

TOXOIDES CRUDO M&M Y LATHAM

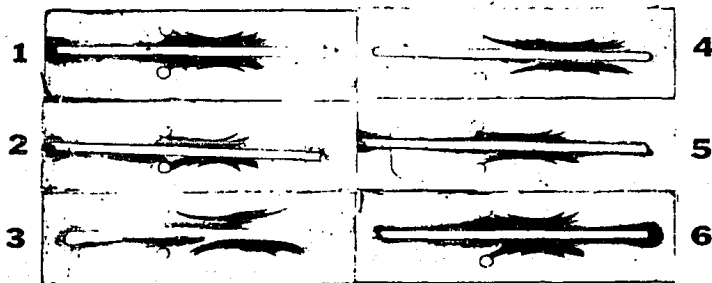


Fig. 13.

<u>GRUPO</u>	<u>ANTISUEROS CONTRA LOS SIGUIENTES TOXOIDES</u>	
1	Toxoide crudo concentrado M&M	6 bandas
2	Toxoide precipitado M&M	6 bandas
3	Toxoide semipuro, fracción 2 M&M	6 bandas
4	Toxoide crudo concentrado Latham	5 bandas
5	Toxoide precipitado Latham	7 bandas
6	Toxoide semipuro, fracción 2 Latham	6 bandas

DISCUSION.

El descubrimiento por Behring y Kitasato en 1880 (2) de que el tétanos era una intoxicación o envenenamiento por una substancia presente en el medio de cultivo de Cl. tetani, abrió las puertas a una -- nueva área de investigación biológica. Ellos demostraron a la vez que la toxina tratada con tricloruro de yodo era capaz de provocar una respuesta en animales sometidos a inyecciones de dicho producto; y que el suero de los animales tratados de esta manera, era capaz de neutralizar la toxina y evitar así el envenenamiento de animales que eran inyectados con la mezcla suero-toxina.

Posteriormente el descubrimiento hecho por Ramón en 1923 (1) de que el tratar la toxina con formol provocaba la formación de una anatoxina como la llamaron los franceses, da la oportunidad de iniciar el tratamiento preventivo en humanos, el cual realmente a resultado eficaz, es decir el toxoide tetánico es un buen inmunógeno que se ha comprobado durante el tiempo.

La O.M.S. ha reglamentado el uso de vacunas en humanos, y el toxoide destinado al humano debe tener algunas características ya es tablecidas como son: concentración de proteína, determinación de unidades de floculación (Lf/ml), potencia e inocuidad.

La implementación de estas medidas ha resultado en la homogeneidad de los productos puestos al mercado, sin embargo, estos valores están dados con el uso del toxoide crudo, es decir es el medio de -- Latham donde ha crecido el Cl. tetani, concentrado y detoxificado, el que sirve como antígeno: Se utiliza el medio de Latham para evitar la presencia de péptidos o proteínas de la infusión de corazón de buey que contiene el medio Müller y Miller.

Sin embargo el crecimiento y lisis de la bacteria en el medio de Latham da como resultado la presencia de múltiples proteínas en el producto utilizado como vacuna en el humano.

Por otra parte, este toxoide es utilizado también para la inmunización de animales (caballos) donadores de suero antitetánico para uso de humanos. De esta inmunización resulta la obtención de un suero con buena capacidad de neutralizar la toxina, sin embargo, como las Igs de estos caballos no se purifican por cromatografía de afinidad, esto resulta en la obtención finalmente de un suero que tiene anticuerpos contra todos los antígenos a que el animal estaba expuesto, aunado a los anticuerpos contra todos los contaminantes del toxoide, de tal manera que la cantidad de proteína heteróloga inyectada a un paciente de tétanos es proporcional a la respuesta del animal, es decir, que mientras mayor sea la respuesta del animal la concentración real de antitoxina estará representada en una menor cantidad de proteínas.

Por otra parte, dentro de los establecimientos productores de antitoxina tetánica en caballos, es común el escuchar que la toxina del medio de M&M es mejor inmunógeno que la del Latham, aunque los esquemas de inmunización habitualmente se manejan como volumen y no se compara realmente la respuesta a concentraciones similares de toxina o toxoide. El pensar que la toxina es igual tanto si se produce en M&M o Latham, permite considerar que la capacidad inmunogénica debe ser la misma.

Así mismo, puesto que la toxina es una proteína con actividad específica en neuronas con mecanismo de acción inhibitorio, es posible pensar que los efectos secundarios de la vacunación en humanos se deben a los contaminantes presentes en el toxoide.

Bajo este ánimo, se puede considerar que la purificación del toxoide tetánico, dará como consecuencia:

1. Eliminación de los efectos secundarios a su uso en humanos.

2. La respuesta inmune será mayor al eliminar la competencia antigénica.
3. La cantidad de proteína necesaria para inmunizar será menor.
4. Al obtener un incremento en la respuesta inmune de los caballos utilizados como donadores de antitoxina, la cantidad de proteína heteróloga utilizada en el tratamiento de un caso de tétanos será menor, disminuyendo la posibilidad o severidad de cuadros de hipersensibilidad.

El tratar de purificar el toxoide tetánico a partir de un -- toxoide que cumpliera con los requerimientos de O.M.S., Tablas III, IV, -- V y VI, se realizó inicialmente siguiendo la técnica descrita por Barbosa, -- H. (33), de acuerdo con el antecedente (38, 39) de que la toxina tetánica es eficazmente purificada por DEAE-celulosa (intercambio iónico), se -- utilizó en un principio con el toxoide tetánico, sin embargo, el toxoide es retenido por la DEAE-celulosa, lográndose separar de ésta con el gradiente de NaCl. Por esta razón se decidió probar CM-celulosa encontrando -- nuevamente que el toxoide no se separa de los contaminantes con el uso -- de cromatografía de intercambio iónico. Se decidió probar la filtración en -- gel con Sephadex G-100-120, debido a que la toxina tetánica tiene un peso molecular entre 140,000 y 160,000 daltones, por lo que se pensó que el toxoide tetánico saldría en el volumen de exclusión y los contaminantes de -- menor peso se filtrarían en la columna, siendo el resultado negativo, ya que todo el toxoide junto con los contaminantes salió en el volumen de ex -- clusión, razón por la cual probamos la filtración con Sepharosa 4B-200 -- que presenta un rango cromatográfico de 6×10^4 - 20×10^6 peso molecular para proteínas; con esta resina se obtuvieron dos fracciones: la primera -- sin color y sin actividad floculante, y una segunda conteniendo el toxoide.

El realizar estos ensayos con las diferentes resinas fué con el objeto de encontrar un sistema de purificación de toxoide tetánico que resulte "ideal", esto es un sistema que separa el componente específico -- de las otras proteínas bacterianas y constituyentes del medio de cultivo,

b) que no afecta significativamente la producción e actividad biológica de la proteína específica, c) que sea un procedimiento reproducible que se preste para producción en gran escala y d) que excluya la posibilidad de que se incorpore al producto final sustancias que tiendan a causar reacciones adversas en el hombre.

Se han reportado varios estudios de la preparación de toxoide tetánico purificado, (40, 41, 42, 43). Sin embargo, sólo el fraccionamiento con sulfato de amonio (44) o la precipitación con alcohol (40) se usan generalmente para la purificación de toxoide tetánico crudo en gran escala.

Empleando el fraccionamiento con alcohol, Pillemer et. al. afirmaron en 1946 (40) que este método no produjo el más alto grado de purificación y que el toxoide purificado aún contenía otras proteínas bacterianas. Con estos criterios la filtración en gel parece representar un mayor refinamiento de los métodos actuales de purificación de toxoide tetánico.

Al seleccionar el tipo de cromatografía a utilizar para la purificación del toxoide tetánico, en la Tabla VIII y IX, se presentan los resultados del proceso de purificación desde el toxoide crudo concentrado, hasta el obtenido con la Sepharosa 4B-200, haciendo notar que los pasos principales en este proceso de purificación se combinaron; tanto los métodos "tradicionales" en la industria (precipitación con sulfato de amonio) y la filtración en gel.

El resultado del empleo de todas las técnicas para la purificación de toxoide tetánico, analizados por las técnicas Inmuno-electroforesis, Electroforesis en gel de acrilamina y actividad específica, como se observa en las figuras 9, 10, 11 y 12 correspondientes a los productos obtenidos en el proceso de purificación, y los toxoides utilizados como inmunógenos, revelados con un suero dirigido contra el toxoide crudo, así como la utilización de los sueros de los conejos inmunizados con los diferentes toxoides, muestran que realmente aunque cambian los patrones de precipitación, el número de complejos Antígeno - Anticuerpo,

es más o menos similar y sobre todo el analizar la respuesta inmune de -- los conejos nos proporciona una seguridad mayor, ya que este es un método altamente confiable pues el aparato inmune puede reaccionar contra mínimas concentraciones de contaminantes y producir abundantes anticuerpos, la presencia de estos anticuerpos se revelaría al hacerlos reaccionar contra una mezcla de antígenos como el toxoide completo. En este caso en los -- grupos de estudio las Inmunolectroforesis se realizaron con el toxoide crudo, por lo que se presentó la reacción en contra de los varios epitopes -- que se presentan en la molécula del toxoide y con los contaminantes presentes en el mismo.

Esta técnica combina la electroforesis con las reacciones de precipitación inmunológica, y se espera obtener en cada antisuero probado, una sola banda de precipitación específica contra el antígeno correspondiente, excepto en el caso en que el antígeno fuera toxoide total (crudo). En todos los grupos, los antisueros se probaron contra toxoide crudo de ambos medios de cultivo, de tal forma que si se obtenía una sola banda, se podía confiar en la pureza de los antígenos empleados para la inmunización animal (44).

Respecto a los geles de poliacrilamida al 10% con SDS figura 11, no se logró determinar el grado de pureza de los toxoides debido a la presencia del "barrido" y la no definición de bandas, además que aún con geles al 4%, se observó que parte del toxoide no entra al gel una parte se queda en la entrada al gel concentrador y otra en el inicio del gel separador, este hecho lo atribuimos a la reacción del formaldehído con la toxina, ya que el formaldehído forma puentes metilénicos en los grupos amida, guanidil e indoles de las proteínas de la toxina y medio de cultivo.

En la preparación de toxoides y vacunas se presentan uniones cruzadas entre grupos aminometilol y grupos fenol, imidasol o indol. La fijación del formol en estas condiciones de pH 7, durante un mes a 40°C es irreversible (45, 46).

Es posible que el "barrido" que se presentó en los geles -- sean productos de degradación ya que como se mencionó anteriormente (8)

existen en el medio de cultivo enzimas proteolíticas producidas por la bacteria; o bien la presencia de formol libre, aunque para evitar esto último las muestras se dializaron previamente a la electroforesis.

La estimación de la actividad específica, relacionando la actividad floculante y la cantidad de proteína en mg de nitrógeno proteico no dializable (20), indican que aunque cualitativamente (IEF y PAGE) no demuestran la eliminación de contaminantes si se observa un incremento de dos veces la capacidad floculante de los preparados en relación a la concentración de nitrógeno proteico.

Este aumento de la actividad floculante en el toxoide Müller y Miller del crudo al semipuro es notable; en comparación del Latham que la diferencia no es tan marcada, esto puede deberse principalmente al medio de cultivo ya que el toxoide Müller y Miller además de tener los mismos componentes que el medio Latham, contiene infusión de corazón de res como fuente adicional de nitrógeno, y al comparar los datos de la concentración de proteína por mg de nitrógeno proteico no dializable entre los dos toxoides, vemos que en el Müller y Miller crudo contiene tres veces más proteína que el Latham, en general en las tres preparaciones el toxoide Müller y Miller presentó más cantidad de proteína que el toxoide Latham, aunque en los datos obtenidos de los toxoides semipuros las diferencias son mínimas.

A pesar de estos resultados la valoración de la respuesta inmune se realizó cualitativamente con inmunoelectroforesis y cuantitativamente con el método de IPSEN.

La valoración cuantitativa de la respuesta inmune realizada de acuerdo con el método de IPSEN (35) y la obtención de los valores finales, según el sistema de Reed-Muench (3), nos muestran que las cantidades de antitoxina obtenidas de los diferentes grupos de conejos, inmunizados con las 3 preparaciones de toxoide de ambos medios de cultivo, son inversamente proporcionales a la concentración de proteína, esto es evidente al observarse los datos obtenidos con el toxoide tetánico M&M -- Tabla X. Relacionando la concentración de proteína mg N/ml y las uni-

dades Antitóxicas por ml tenemos que del toxoide tetánico crudo sin tratamiento al toxoide tetánico semipuro, la concentración de las unidades antitóxicas se incrementa casi 3 veces; con el toxoide tetánico Latham - Tabla X las diferencias en la concentración de proteína son mínimas, pero aún así del toxoide tetánico crudo, al semipuro se obtiene un incremento en el valor de las unidades antitóxicas por ml.

Al tener una mayor concentración de proteína en los toxoides crudos y de acuerdo con los análisis de pureza efectuados es -- evidente que se tiene una mezcla de antígenos que pueden estar compitiendo intermolecularmente para desencadenar la respuesta inmune, esto es, se van a presentar varios epitopes a la vez que van a estimular ya sea la producción de células T ayudadoras o la producción de células T supresoras (18). Este hecho se puede valorar de acuerdo con la respuesta de anticuerpos, por lo que en los toxoides semipuros, al haber eliminado contaminantes, el fenómeno de competencia pudo haberse eliminado o bien disminuido notablemente, siendo la respuesta inmunológica mucho más específica, ya que el efecto promotor de la respuesta inmune va a depender del número de estimulaciones, y de la proliferación clonal inducida por el estímulo previo (47). De tal manera que es posible que al disminuir la concentración de los contaminantes, las poblaciones celulares, sean específicas para la molécula del toxoide.

La eliminación de contaminantes puede evitar los efectos secundarios que se observan con los toxoides actualmente utilizados y - la sensibilización de las personas a sustancias que se emplean en el medio del Clostridium tetani; y aunque existen antecedentes (19, 20) de - que los contaminantes presentes en las preparaciones crudas de toxoide tienen efecto de adyuvante, en este trabajo se encontró que la mayor - capacidad Inmunogénica corresponden a los toxoides con menor número de contaminantes.

Por los datos obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que los toxoides preparados a partir de toxina tetánica cruda, -- representan polímeros heterogéneos de proteínas diversas, que sin embargo adquieren ciertas características fisicoquímicas que impiden su - separación por técnicas de intercambio iónico y filtración en gel.

Esta polimerización queda demostrada por cromatografía en gel, Inmunolectroforesis y Electroforesis en gel de acrilamida - SDS. Por estos motivos se puede concluir que para la producción de un toxoide puro, deberá entonces iniciarse con la purificación de la toxina para su destoxificación posterior.

Así mismo, se puede concluir que la inmunogenicidad del toxoide tetánico no depende de la fuente o medio de cultivo que se utiliza, ya que a concentraciones similares de Unidades de Flocculación (Lf/ml), y proteína, la respuesta de los animales inmunizados es muy similar independientemente si el medio de cultivo fue Latham o Müller y Miller.

A P E N D I C E

SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 0.1M pH 7.4

Solución A. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fosfato de sodio dibásico 0.2M 53.61 g/l

Solución B. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fosfato de sodio monobásico 0.2M 27.59 g/l

Solución C. Se mezclan las soluciones A y B, ajustándose el pH a 7.4

Se toman 50 ml de la solución C más 7.4 g. de NaCl, se afora a un litro con agua desionizada para tener la concentración de 0.1M pH 7.4.

Cloruro de Bario Acidificado.

Para 100 ml de solución se pesan 7.5 g de cloruro de bario y 3.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado, se afora a 100 ml con agua desionizada.

Metanol 7.5% - acetato de sodio 0.1M pH 4.5

Las cantidades de esta solución se calculan de acuerdo al volumen del toxoide, se agregan a éste, cuidando de que el metanol esté a -4°C , se mezclan los dos reactivos con el toxoide, y se ajusta el pH a 4.5 con ácido acético (gotas).

Solución de Etilendinitrilotetracético (EDTA) sal disódica 0.01M pH 7.6

Se pesan 3.36 g de EDTA, se disuelven en agua desionizada, se ajusta el pH a 7.6 con NaOH 5N, y se afora a 1 litro.

Técnica de Lowry para determinación de proteínas.

Se preparan las siguientes soluciones:

a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% (sulfato de cobre pentahidratado)

b) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 2% (tartrato de sodio potasio)

c) Na_2CO_3 al 2% en una solución de NaOH 0.1N

- d) Reactivo de Folin dilución 1:2 con agua destilada (se prepara antes de usar)
- e) Se mezclan 1 ml de la solución a más un ml. de la solución b más 98 ml de la solución c (se prepara antes de usar).

Proteína de referencia albúmina sérica bovina (ASB) 1 mg/ml para la realización de la curva patrón.

Curva Patrón.

Preparar los tubos de ensayo por duplicado de la siguiente manera:

<u>No. tubo.</u>	<u>Concentración de proteína</u>	
1	100 µg/ml	a) .2 ml de ASB + 1.8 ml de PBS
2	50	b) 1 ml de a + 1 ml de PBS
3	25	c) 1 ml de b + 1 ml de PBS
4	12.5	d) 1 ml de c + 1 ml de PBS
5	- 0 -	1 ml de PBS (blanco)

Muestra problema.

De la muestra problema se realizan diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000, llevando todas las diluciones a 1 ml con PBS.

A todas las diluciones de la curva patrón y muestra problema se les agrega 4 ml de la solución e, se agitan inmediatamente y se dejan reposar 10 minutos, al término de este tiempo, se le agrega 0.4 ml de la solución d, agitándose rápidamente dejándose reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

Medir espectrofotométricamente la absorbancia a 600 nm empleando el tubo 5 como blanco.

Construir la curva patrón con los valores de absorbancia a 600 nm vs µg de proteína. Los valores de absorbancia de la muestra problema se extrapolan en la curva patrón obteniéndose la concentración en µg de proteína / ml con base en la cantidad de muestra que se puso inicialmente en el tubo (dilución).

Determinación de Nitrógeno proteico por el método de KJELDHAL.

Reactivo de Nessler: (por litro)

4 g de KI

4 g de HgI_2 (reacciona con el papel aluminio)

1.75 g Goma Ghatti.

Modo de prepararse.

Disolver el KI y el HgI_2 en 25 ml de H_2O desionizada; agregar la goma ghatti a 750 ml de agua desionizada hirviendo, continuar hirviéndola hasta que se disuelvan los trozos grandes (aprox. 1 hora).

Agregar la solución de KI y HgI_2 a la solución de goma ghatti, aforar a 1 litro y filtrar en un matraz.

La muestra estándar es sulfato de amonio con una concentración de N_2 de 1 mg / ml.

- Muestra, agua desionizada.

- Muestra problema.

- 1.- Se coloca en los tubos para digestión 1 ml de muestra que contenga aproximadamente de 20-100 μg de proteína con 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado y se deja digerir aproximadamente 3 horas.
- 2.- Se apaga y se deja enfriar para agregar 3 gotas de peróxido de hidrógeno y se pone a digerir otros 15 minutos.
- 3.- Se apaga y se numeran 8 tubos grandes en los cuales se colocan 1 ml de agua desionizada que servirá para hacer la curva patrón.
- 4.- Se numeran tantas probetas de 10 ml como muestras se tengan, se sacan del tubo digestor las muestras (estándar, agua y problema) con una pipeta y se colocan en la probeta, teniendo cuidado de que no -- quede nada embarrado, posteriormente se afora a 10 ml con agua desionizada.
- 5.- Con el estándar (sulfato de amonio) se hacen 8 diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256.
- 6.- De las muestras problema, se realizan diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 1:10,000, llevándolas a 1 ml con agua desionizada.
- 7.- Se agregan a todas las diluciones 2 ml del reactivo de NESSLER y se agitan.
- 8.- Se agregan 3 ml de NaOH 2N (hecha con agua desionizada), se agitan los tubos y se deja incubar 15 minutos.

- 9.- Se leen los tubos en el espectrofotómetro a 440 nm.
- 10.- Para la determinación del nitrógeno proteico de las muestras problema se realiza la curva patrón con el estándar de sulfato de amonio graficando concentración de nitrógeno en $\mu\text{g/ml}$ vs densidad óptica, las densidades ópticas de las muestras problema se extrapolan en la curva obteniéndose de esta manera la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de el nitrógeno proteico no dializable de la proteína.

Determinación de Unidades de Floculación (Lf) técnica de Ramón 1923.

La prueba de floculación de Ramón en tubo se lleva a cabo usando una antitoxina tetánica purificada, modificada por pepsina y estandarizada.

- 1.- Diluir la antitoxina patrón de Lf conocido hasta lograr 100 Lf / ml, usar como diluyente solución reguladora de fosfatos.
- 2.- En tubos de ensayo colocar las siguientes cantidades de antitoxina, regulador de fosfatos y toxina o toxoide (según sea el caso a medir).

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Antitoxina	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1 ml
Regulador	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	- 0 -
Toxina o Toxoide	1	1	1	1	1	1	1	1	1 ml

- 3.- Agitar e incubar en un baño maria a 50 °C.
- 4.- Revisar constantemente los tubos y anotar el orden de floculación y el tiempo del mismo.
- 5.- Calcular las Lfs de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Lf} = \frac{\text{Vol. de antitoxina estándar (primer tubo en flocular)} \times \text{Lf antitoxina}}{\text{Volumen de la toxina o toxoide}}$$

Determinación de unidades antitoxicas, método de IPSEN.

Toxina Tetánica con 290 L+/10

Antitoxina tetánica estándar con 5 UIA/ml se realiza una dilución 1:5 para tener 1 UA/ml

Buffer para la muestra:

0.5 M de tris-HCl, pH 6.8	10.0 ml
Glicerol	1.0 ml
EDTA	0.0074 g
SDS	0.1 g
Azul de bromofenol	0.1 %
Mercaptoetanol	100.0 μ l
6	
DTT	5.0 μ l para 50 μ l de muestra

Agregar a la muestra volumen a volumen.

Someter a ebullición en baño maría durante 5 minutos.

Calcular a razón de 50 a 100 μ gr de proteína por carril.

el volumen de la muestra no debe exceder de 150 μ l por carril en geles con 0.75 mm de grosor.

La muestra no deberá contener más de 0.01 M de sales para que el corrimiento sea adecuado.

PROCEDIMIENTO

El gel se prepara siguiendo el orden establecido en la siguiente lista.

- Se monta la cámara de electroforesis en placa fina.
- Colocar (para geles de .75 mm de grosor) 17.5 ml del gel de separación.
- Añadir 2 ml de agua para facilitar la uniformidad del gel
- Esperar a que polimerice (aproximadamente 15 a 20 minutos)
- Voltar la cámara para desechar el agua que se añadió.
- Preparar el gel de entrada o concentración y colocar la cantidad requerida para cubrir adecuadamente los peines (al hacer este gel tener cuidado de que no se formen burbujas, ya que si esto sucede se puede presentar interferencia en el corrimiento).
- Dejar polimerizar este gel aproximadamente 30 minutos.
- Retirar los peines y secar cada carril con una tira de papel filtro.
- Agregar la muestra con mucho cuidado.
- Llenar con buffer de corrida cada uno de los carriles sin que la muestra se mezcle con el buffer.

- Colocar la cámara en el recipiente de electroforesis.
- Agregar el buffer de corrida cuidando de que este tape bien el electrodo
- Conectar la cámara en la fuente de poder y correr el gel a 40 mA por lado.
- Dejar correr hasta que llegue aproximadamente 5 cm antes del final del gel.
- Desconectar la cámara de la fuente de poder.
- Quitar el sistema de enfriamiento.
- Separar el gel con mucho cuidado para ponerlo a teñir.

Solución para teñir el gel.

0.25 % de azul de Coomasie en metanol-ácido acético y agua destilada a una relación de 5:1%.

- Se cubre el gel con esta solución y se deja durante 7 a 12 horas a temperatura ambiente ó 30 minutos a 45 °C sin dejar que la solución llegue a ebullición.
- Quitar posteriormente la solución (se puede desechar o bien utilizar nuevamente por varias veces después de que se filtre en un papel Wathman del número 1).

Solución para desteñir gel.

- Acido acético 7%
- Metanol 5%
- Agua destilada.

Colocar el gel teñido en esta solución, calentar durante 1 hora sin llegar a ebullición, y hacer varios cambios de la solución hasta tener una buena re solución de las bandas resultantes.

Inmunolectroforesis.

Reactivos.

- Agar al 1%
- Solución amortiguadora de barbital 0.05 M pH 8.6
- Azida de Sodio al 0.02 %.

Preparación:

Se pesa el agar y la azida de sodio, se agregan a la solución amortiguadora de barbital, se coloca la mezcla en baño maría hasta que se di-

suelvan los cristales del agar, se utiliza inmediatamente. Se colocan aproximadamente 25 ml de la solución del agar, sobre un inmunomarco que contiene 6 portaobjetos, se deja solidificar el agar a temperatura ambiente en -- una cámara húmeda.

Se perfora el agar en los inmunomarcos en cada portaobjetos marcando un canal y dos pozos, uno a cada lado del canal. El agar se extrae de cada pozo, y se coloca en éstos el antígeno.

Se colocan el o los inmunomarcos en una cámara de electroforesis con la misma solución amortiguadora de barbita; se forma un puente de corriente con tiras de papel filtro entre los inmunomarcos y la solución de corriente.

Se aplica una corriente de dos mA por cada portaobjetos, a temperatura ambiente, la duración de la electroforesis se mide por el desplazamiento de la albúmina teñida con azul de bromofenol colocada previamente en -- uno de los pozos hacia el cátodo, aproximadamente 4.5 cm desde el pozo en el que se puso la muestra. Al concluir, se extrae el agar del canal previamente marcado, se colocan los inmunomarcos en una cámara húmeda, y se añade en cada canal el antisuero, este se deja difundir 24 horas a temperatura ambiente.

Cuando los anticuerpos se encuentran con su antígeno, forman complejos antígeno-anticuerpo insolubles y por ello aparecen en el agar las bandas de precipitación que revelan su presencia.

Se lavan los inmunomarcos colocando estos en solución salina 0.15 M a 4 °C , cambiándose esta solución 3 veces al día durante 3 días.

Se colocan los inmunomarcos en agua destilada 2 horas, se sacan y se les coloca tiras de papel filtro, dejándose secar al aire.

Ya secas, se les retira el papel, se tiñen con amido negro al 0.1% en baño total durante 10 minutos.

Se ponen a desteñir en una solución de ácido acético al 10% en baño total durante 2 horas a temperatura ambiente.

Determinación de ácidos nucleicos.

Soluciones:

- Solución de ADN purificada 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Solución de ADN purificada por el alumno, o muestra problema.
- Solución de ADN problema.
- Solución acuosa de acetaldehído 16 mg/ml

Reactivos:

- Ácido acético glacial.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Difenilamina.

Desarrollo:

Preparación del reactivo de Diesche.

Pesar 1.5 g de difenilamina y añadirlos a una mezcla de 100 ml de ácido acético glacial y 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado (disolver perfectamente).

Agregar 0.5 ml de una solución acuosa de acetaldehído 1:50 (se debe utilizar fresca y mezclar).

Se preparan por duplicado tubos con concentraciones de ADN de 0, 5, 10, 20, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por dilución con una solución de TCA al 5% (de la solución de ADN purificado por el alumno y de la solución problema se toman alícuotas de 1 ml y se sigue el mismo procedimiento).

Se calientan los tubos en baño maría a 90 °C durante 15 minutos y los problemas se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos.

Se colecta el sobrenadante, que contiene los ácidos nucleicos, y se le añade 2 ml del reactivo de Diesche. Se incuban los tubos en baño maría a 50 °C por 1 hora. Se enfrían y se leen en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

Al precipitado centrifugado se le añaden unas gotas de reactivo de Biuret.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
1. Modelos estructurales de Toxina tetánica propuestos por <u>Bizzini et. al.</u> y Matsuda y Yoneda.	22
2. Modelo estructural de Toxina tetánica intracelular propuesto por Craven-Dawson.	23
3. Esquema de Inmunización utilizado para estudiar la respuesta inmune al toxoide tetánico en conejos.	38
4. Cromatografía en DEAE-celulosa del Toxoide tetánico Müller y Miller.	47
5. Cromatografía en CM-celulosa del Toxoide tetánico Müller y Miller.	48
6. Cromatografía en Sephadex G-100-120 del Toxoide Tetánico Müller y Miller.	49
7. Cromatografía en CM-celulosa y Sephadex G-100-120 del Toxoide tetánico Müller y Miller.	50
8. Cromatografía en Sepharosa 4B-200 del Toxoide tetánico Müller y Miller.	51
9. Inmunolectroforesis de las fracciones obtenidas en los ensayos de purificación del Toxoide Tetánico Müller y Miller.	52
10. Inmunolectroforesis de los productos en los diferentes pasos de purificación del toxoide tetánico de ambos medios de cultivo y de la toxina cruda.	56
11. Electroforesis de toxina y toxoides en los diferentes pasos de purificación del toxoide tetánico.	58
12. Inmunolectroforesis de las preparaciones de toxoide utilizados como antígenos en ambos medios de cultivo.	60
13. Inmunolectroforesis de los Sueros de Conejo después de la Inmunización.	62

LISTA DE TABLAS

Pág

I	Mortalidad por tétanos en los Estados Unidos Mexicanos	24
II	Inmunización con Toxoide Tetánico en la República Mexicana.	25
III	Actividad floculante de la Toxina Tetánica Müller y Miller.	43
IV	Control de Esterilidad en la Toxina tetánica Müller y Miller.	44
V	Registro de la Dosis Mortal Mínima de la Toxina tetánica Müller y Miller.	45
VI	Control de Atoxicidad del Toxoide tetánico Müller y Miller.	46
VII	Análisis de los ensayos de purificación del Toxoide tetánico Müller y Miller.	53
VIII	Análisis del proceso de purificación del Toxoide tetánico Müller y Miller.	54
IX	Análisis del proceso de purificación del Toxoide tetánico Latham.	55
X	Actividad floculante de los Toxoides y Concentración de Unidades Antitóxicas en el suero de conejos.	61

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Germanier, R. 1984. BACTERIAL VACCINES. 1a. Ed. Academic Press, Inc. London. 38-64 pp.
- 2.- Burróns, W. 1974. TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 3a. Ed. Interamericana. México. 542 pp.
- 3.- Davis, D., Dublecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. 1980. MICROBIOLOGY. 3a. Ed. Acribia. España. 768 p.
- 4.- Merchat-Packer. 1980. BACTERIOLOGIA Y VIROLOGIA VETERINARIA. 7a. Ed. Harper Internacional. U.S.A. 1355 p.
- 5.- Barbosa, H. 1979. Toxina y Antitoxina Tetánicas. Proceso de Purificación y Producción a Nivel Industrial. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina. México. UNAM.
- 6.- Bizzini, B., Turpin, A. and Raynaud, M. 1973. On the Structure of Tetanus Toxin. Naunyn Schimmlerberg's Arch. Pharmacol 227: 271-288.
- 7.- Matsuda, M. and Yoneda, M. 1975. Isolation and Purification of two Antigenically active, "complementary" polypeptide fragments of tetanus neurotoxin. Infect. and Immun. 12: 1147-1153.
- 8.- Torsten, B., Parchat, S.H. and Engelhardt, H. 1979. Structure of tetanus toxin. Demonstration and Separation of a specific enzyme converting intracellular tetanus toxin to the extracellular form. The Journal of Biological Chemistry. 254:(21) 10728-10733.
- 9.- Kumate, J., Gutiérrez, G. 1978. MANUAL DE INFECTOLOGIA. 6a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México. 208-220 pp.
- 10.- Van Heyningen, W.W., Bellanby, J. 1971. Tetanus Toxin in: S. Kadis et. al. (editors). Microbial toxin vol.II. A. Bacterial Proteins Toxins, New York, London, Academic Press. 69-108 pp.
- 11.- Curtis, D.R. and De Groat, W.C. 1968. Tetanus Toxin and Spinal inhibition. Exptl. Brain. Res. 10: 208-212.
- 12.- World Health Organization Expert Committee. 1979. "Manual for the production and Control fo Vaccines", W.H.O. Blg/UNDP/77.2 Rev. I. W.H.O. Genova.
- 13.- Carrada, T. 1977. La vacunación antitetánica en la República Mexicana. Investigación Preliminar. Salud Pública de México. 4: 579-596.
- 14.- Edsall, G. 1969. Specific prophylaxis tetanus. JAMA 171: 417-427.

- 15.- White, G., Barnes, M., Griffith, H. 1969. Duration of Immunity after active immunization against tetanus. *Lancet*. 2: 95-96.
- 16.- Fardon, F. 1967. Unusual Reactions to Tetanus Toxoid. *JAMA*. 199: 125-126.
- 17.- Roitt, I. 1984. *ESSENTIAL IMMUNOLOGY*. 5th. Ed. Blackwell. Scientific. Pub. London, U.k. 697 p.
- 18.- Taussing, J. 1973. Antigenic Competition. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 60: 125-174.
- 19.- Raynaud, M., Bizzini, B. et. al. Turpin, A. 1971. Hétérogénéité de L'Anatoxine Tétanique. *Ann. Inst. Pasteur*. 120: 801-815.
- 20.- Bizzini, B., Turpin, A. et Raynaud, M. Pouvoir Immunogène D'Anatoxines Tétaniques de Divers Degrés de Pureté et de Polymerisation. *Ann. Inst. Pasteur*. 120: 791-799.
- 21.- Ramón, G. 1922. Flocculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtériques. *C.R. Soc. Biol. (París)* 86: 661.
- 22.- Burton, K. 1956. A study of the condition and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochemical. J.* 62: 315,-
- 23.- Gilles, K. and Myers, A. 1965. An improved diphenilamine method for estimation of desoxiribonucleic acid. *Nature*. 206: (4979), 93,-
- 24.- Williams, A., Chase, W. 1968. *Method in immunology and immunochemistry*. Vol. II Academic Press, London, New York.
- 25.- Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. and Randall, J. 1952. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 26.- Becker, L. et. al. 1971. *Methods in immunology and immunochemistry*. 3th. ed. Vol. 1. Edited by: Williams, A. and Chose, W. Academic Press. New York and London.
- 27.- Campbell, H., Garvey, S. et. al. 1970. *Methods in immunology*. 2da. Ed. W.A. Benjamin, Inc. New york. 260-267 pp.
28. Ouchterlony, O. 1968. *Handbook of Immunodiffusion and Immunolectrophoresis*. Ann. Arbor. Science. Publishers. Mich.
- 29.- Gel Filtration Theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals. 3-69 pp.
- 30.- Weber, K. and Osborn. 1969. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- 31.- Freund, J. 1947. Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.* 1: 291-298.

- 32.- Fudenberg, H. Stites, P. et. al. 1980. INMUNOLOGIA CLINICÁ. 2da. Ed. El Manual Moderno, S.A. México. 358 p.
- 33.- Barbosa, H., Ravines, J., Garza, J. y Larralde, C. 1981. Producción Masiva de Antitoxina Tetánica en Cerdos. Tec. Pecuaria en México. 41: 42-51.
- 34.- Kirk, L. 1959. KJELDAHL method for total nitrogen. Anal. Chem. 22: 354-358.
- 35.- IPSEN HOHANNES. Inherent Immunizability to tetanus toxoid. Based on Studies in Pure Inbred Mice. 72: 243-247. 1953.
- 36.- National Institute of health. Boletin by Division of Biological Standars. Bethesda 14, maryland. U.S.A. Department of Healthy Education and Wálfare Public Health Service. 4th. revisión 1952.
- 37.- Nájera, A., García, B., Domínguez, O., González, P., Martínez, J. y Aguilar, E. 1980. MANUAL DE LABORATORIO DE PRODUCCION Y CONTROL DE BIOLOGICOS. E.N.C.B. I.P.N. México. 43-58 pp.
- 38.- Damson, J., and Mauritzen, M. 1969. Studies on Tetanus Toxin and Toxoid. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1217-1227.
- 39.- Bizzini, B., Blass, J. Turpin, A., Raynaud, M. 1970. Chemical Characterization of Tetanus toxin and Toxoid. Eur. J. Biochem. 17: 100-105.
- 40.- Pillemer, L., Grossberg, B. and Wittler, R. 1948. The Immunochemistry of Toxins and Toxoids. J. Immunol. 54: 213,-
- 41.- Moloney, J. and Hennessy, N. 1942. J. Biochem. 36: 544,-
- 42.- Bizzini, B., Turpin, A. and Raynaud, M. 1969. Production et Purification de la Toxine Tetanique. Ann. Inst. Pasteur. París. 116: (5) 686-712.
- 43.- Latham, C., Jennes, P. et. al. 1965. Purification and Characterization of Tetanus Toxoid and Toxin. J. Immunology. 95: (3) 487-493.
- 44.- Levine, L. and Stone, J. 1951. J. Immunol 67: 235,-
- 45.- Fraenkel-Conrat, H. and Olcott, S. 1948. J. American Chem. Soc. 68: 827-843.
- 46.- Blass, J., Bizzini, B. et. Raynaud, M. 1969. Etude Sur le mecanisme de la detoxification des toxines proteiques par le formol. Ann. Inst. Pasteur. París. 116: (4) 501-521.
- 47.- Dean, R. and Webb, A. 1928. Determination of rate of antibody (precipitants) production in rabbit's blood by method of "optimal proportion". J. Path. Bact. 32: 89-90.