

PRODUCCION DE TOXINA TETANICA EN DOS MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES (1)

Raúl Demarchi, Mirta Casagne, Carlos Gómez, Ernesto Fischer, Nélica Martínez
y Dante Bernagozzi

R E S U M E N

En el presente trabajo se comparan dos medios de cultivo para la producción de toxina tetánica. El medio de cultivo clásico a base de digerido de estómagos de cerdo y agua de carne, y un medio sintético con hidrolizado tripsico de caseína y peptona de soya.

El medio sintético permite obtener un toxoide cuya actividad es semejante a la del toxoide obtenido con el medio clásico con un costo inferior en un 24 % considerando únicamente el valor de la materia prima y cuyos valores de nitrógeno son de 2,7 gamas por Lf frente a 9 gamas por Lf del obtenido por el del medio clásico.

Por lo expuesto los autores consideran justificado el empleo del medio sintético pues permite abaratar la producción y provee productos de alta purificación. Los estudios continúan a fin de determinar las variables que inciden en la producción "standarizada" de toxinas y la eficacia de los antígenos obtenidos de las mismas.

TETANIC TOXIN PRODUCTION IN TWO DIFERENT CULTURE MEDIUM

S U M M A R Y

In this work we use two comparative culture medium of tetanic toxin production. One of the culture medium is a classic broth upon the base of digested pig stomach with meat broth and the other is synthetic tripsic hydrolized caseine and soys pepton.

The sinthetic medium yield a toxoid in which the activity is similar to that obtained by the classical medium and is 42 percent less expensive considering the value of raw material in which the nitrogen value is 2,7 gammas by Lf obtained from the classic medium.

The author consider the employ of sinthetic medium useful because it will permit the low cost of toxoid production and give a high purify product. Studies will be continued to determine the variabilities that they will be do to the standard productions of toxine and the power efficiency of obtained antigens.

(1) Trabajo realizado en la Cátedra de Inmunología General y Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A N T E C E D E N T E S

La educación sanitaria de las poblaciones, en lo que se refiere a la protección de ciertas enfermedades mediante la vacunación específica, ha hecho que cada día sea más urgente la necesidad de elaborar substratum específicos de gran actividad, de escasa reacción secundaria y bajo costo.

Por tal motivo, en las últimas décadas muchos investigadores se han abocado al estudio y conocimiento de las propiedades biológicas y ecológicas de ciertas bacterias productoras de toxinas, lo que permitió reemplazar las fórmulas empíricas preconizadas por Roux y Yersin y Roux y Martin en la preparación de medios de cultivos basados en las mezclas del resultado de la digestión de estómagos de cerdo y agua de carne, por medios de composición química definida: Pappenheim y Johnson; Pappenheim y Robinson y Muller y Miller.

Sin embargo, a pesar de la composición química definida de estos medios de cultivo, aún hoy subsisten inconvenientes que derivan de la calidad de los elementos que intervienen en la fórmula, del volumen del medio, de la calidad de la siembra y hasta de su conservación.

Estas dificultades, que se presentan con relativa frecuencia en los laboratorios dedicados a la elaboración de vacunas y sueros terapéuticos, nos han sugerido la idea de estudiar el problema, tratando de obtener toxina tetánica de buena calidad, con rendimiento estable y de bajo costo.

Para tal fin, hemos comparado dos medios de cultivo: uno, de frecuente uso todavía en los laboratorios de nuestro país, que consiste en ligeras modificaciones del primitivo de Roux y Martin, y otro, con hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya.

MATERIAL Y METODO

En el presente trabajo hemos comparado los resultados de dos medios de cultivo cuya fórmula se detalla a continuación:

Medio "A": A base de digestión de estómago de cerdo y agua de carne.

Composición:

Estómago de cerdo, lavado	
desengrasado y picado ..	150 grs.
Agua	1000 ml.
Acido clorhídrico D1,18 ...	10 ml.

En frascos Pyrex de 9.000 ml. de capacidad, se realiza la digestión durante 2 horas a 48°C. Luego se somete a una temperatura de 85°C durante 15 minutos y se enfría rápidamente, para dejarlo luego en reposo durante 48 horas en la cámara frigorífica a 8°C. Los flóculos que aparecen se separan por filtración en placa de Seitz.

El agua de carne, se prepara por maceración a temperatura ambiente o en la cámara frigorífica, en la proporción de:

Carne de ternera desengrasada y picada	2 kgs.
Agua destilada	3 lts.

Posteriormente se somete a ebullición durante 30 minutos y se pasa por trapo de queso mojado. Se completa a volumen inicial.

Preparación del Medio:

Digestión de estómago de cerdo	1 parte
Agua de carne	1 parte

Se calienta la mezcla a 50°C, se lleva a pH 6,3-6,4; se hierve durante 3', se filtra para separar el floculado y luego se esteriliza a 110°C durante 30 minutos.

Medio "B": Este medio se obtuvo del comercio ya preparado y desecado. Su composición es la siguiente:

Hidrolizado triptico de ca-

seína	17.0 grs.
Peptona de soya	3.0 grs.
Cloruro de sodio	5.0 grs.
Fosfato dipotásico	2.5 grs.
Glucosa	2.5 grs.
Agua destilada	1000 ml.

pH: 7,3

Esterilización a 120°C durante 15 minutos.

A ambos medios de cultivo se les agregó después de la esterilización el 1 % de glucosa esterilizada por tinalización.

Cl. Tetanii:

La cepa usada para estos estudios fue la Copenhaguen, mantenida en agar blando glucosado. La siembra de los medios antes mencionados se efectuó con 10 ml. de un cultivo de 24 ho-

ras en medio Tarozzi, por cada 7 litros de caldo.

Incubación:

Siete días a estufa a 37°C, sin pasaje de hidrógeno.

Toxina:

Se obtuvo mediante la filtración de los medios de cultivo por placa clarificante en filtro de Seitz y por bujía Berkelfeld "W".

Toxoides:

Se obtuvo después de la filtración por el agregado de formol al 40 % en la cantidad del 6 por mil e incubación a la estufa de 37° C. durante 7 días.

Toxicidad:

La toxicidad de las toxinas se midió mediante la inoculación de 1 ml. de diluciones múltiples de 1/10.000 hasta 1/100.000, en 3 lauchas de 20 grs. de peso, en un periodo de observación de 96 horas.

RESULTADOS

Los resultados que se consignan en este trabajo corresponden al valor

medio de cinco experiencias realizadas para cada medio de cultivo.

CUADRO Nº 1

Medio de cultivo "A": D. L. M. por ml.: 40.000

Medio de cultivo "B": D. L. M. por ml.: 100.000

De acuerdo a las cifras anteriores podemos apreciar que el Medio de cultivo "B" compuesto por hidrolizado triptico de caseína, ha dado 2 veces y media más toxina que el medio "A", compuesto por digestión péptica de estómago de cerdo.

Con estos valores, se procedió a transformar las toxinas en toxoides de acuerdo a la técnica descripta precedentemente. Las pruebas de inocuidad de los mismos se realizaron mediante la inoculación de 0,5 mililitros de toxoides a 6 lauchas de 20 grs. de peso cada una, con un periodo de observación de 30 días.

Concentración y purificación de los toxoides:

Para la concentración y purificación de los toxoides se siguió la técnica de Modern y Ruff, basada en la precipitación alcohólica a punto isoeléctrico de 4,7 y a temperatura de menos de 14 grados centígrados.

Valoración de los toxoides concentrados:

Previo clarificación por placas en filtros Seitz y esterilización por bujía Berkelfeld "W", se realizaron controles de esterilidad en agar simple,

caldo simple y en Tarozzi. Las pruebas de inocuidad se realizaron en lauchas de 20 grs. de peso.

La valoración se realizó por la prueba "in vitro" de floculación frente a un suero patrón de 100 Lf por mililitro.

Floculación:

Medio "A" valor: 30 Lf por ml.

Medio "B" valor: 60 Lf por ml.

Comparación de la pureza de los toxoides:

A fin de poder establecer el grado de pureza de los toxoides concentrados, se realizó un estudio comparativo de los medios de cultivo, valorando la cantidad de nitrógeno por ml. del medio y su relación con los Lf mediante el método de Kjeldahl antes y después de la purificación cuyos resultados se consignan en el cuadro Nº 2.

CUADRO Nº 2

	Toxoides Nativos		Toxoides Purificados	
	mg. N/ml.	mg. N/Lf	Gama N/ml.	Gama N/Lf.
Medio "A"	3,40	0,65	270	9
Medio "B"	2,80	0,28	162	2,7

Como podemos observar por el cuadro precedente, la purificación del Medio "A", solamente alcanzó a 117 veces mientras que con el Medio "B" sobrepasó las 500 veces.

Poder Antigénico de los toxoides purificados:

Esta prueba no se hizo con el objeto de comparar la eficacia de un toxoide con respecto al otro, sino simplemente verificar si el toxoide obtenido en el medio de cultivo "B", era por lo menos tan antigénico como los obtenidos en el medio de cultivo "A", que ha sido repetidamente estudiado en nuestro medio, por Sordelli y Ferrari, Modern y Ruff y Manzullo y Arzeno.

Para tal fin solamente hicimos pruebas de protección "in vivo", inoculando para cada toxoide, 6 conejos de 2.000 grs. por vía subcutánea con 10 Dosis Test del antígeno y 21 días más tarde se les hizo una descarga de 1.000 Dosis Letales Mínimas, para cobayo, de una toxina patrón.

Los controles, también conejos de 2.000 grs., en cantidad de 2 por cada partida, inoculados también con 1.000 D. L. M. (cobayo) de la toxina patrón, mueren entre las 48 y 72 horas

Estos resultados demuestran que en el medio de cultivo "B", hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya, se produce toxina cuyo poder antigénico es por lo menos semejante al medio clásico "A", preparado con hidrolizado de estómago de cerdo y agua de carne.

Los estudios para resolver problemas inherentes a la cantidad de inóculo, tipo de cepa, variaciones de las distintas marcas del producto que se encuentran en plaza, y la eficacia de éstas obtenidas en el medio "B", continúan.

Costo de producción de la toxina:

Difícil es tratar de comparar costos de un producto en una institución oficial, ya que en estos organismos intervienen una serie de imponderables que distorsionan el valor real de un producto; es por eso que solamente tendremos en cuenta aquí el costo en plaza de la materia prima para 100 litros de medio de cultivo:

Medio "A": carne y es-

tómago de cerdo .. = 20.600 \$ $\frac{m}{n}$

Medio de cultivo "B"

desechado = 36.000 \$ $\frac{m}{n}$

Sin contar mano de obra, que en el primero se calculan 16 horas mientras que en el medio "B" solamente 4 horas, podemos decir de este último caldo que su costo es de un 45 % más que el medio clásico, pero como

su rendimiento es del 150 % más toxina que el "A" resulta en última instancia que el costo por Lf es de un 42 % más económico que el medio clásico.

DISCUSION

En el presente trabajo se comparan dos medios de cultivos para la producción de toxina tetánica.

El medio de cultivo "A", clásico, a base de digerido de estómago de cerdo y agua de carne, y el medio "B", con hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya; este último obtenido en plaza en forma de un polvo deshidratado.

Sembrados ambos medios con 10 mililitros de un cultivo de *Cl. tetanii* de 24 horas de incubación, se han obtenido los siguientes resultados:

1º) Medio "A": 40.000 D. L. M. para laucha de 20 grs. Medio "B": 100 mil D. L. M. para laucha de 20 grs.

2º) En la purificación y concentración de los toxoides se ha obtenido en ambos la misma pérdida.

3º) Aunque no se estudió exhaustivamente el poder antigénico del medio de cultivo "B" como productor de substractum específico eficaz, podemos decir que la actividad de los toxoides obtenidos en este medio es semejante a la obtenida en el medio clásico.

4º) El costo de producción teniendo en cuenta solamente la materia prima es en el medio "B" del 42 % más económico por Lf que el medio de cultivo "A".

5º) En lo que respecta a la purificación de los toxoides podemos decir que el medio "B" permite obtener valores de Nitrógeno de 2,7 gamas por Lf, mientras que con el medio "A" sólo se obtuvieron 9 gamas de Nitrógeno por Lf.

De acuerdo a estos resultados consideramos justificado el empleo de un medio de cultivo compuesto por hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya para la producción de toxina tetánica, ya que no solamente abarata la producción, sino que permite obtener productos de alta purificación.

Estos estudios continúan a fin de determinar las distintas variables que inciden en producción standarizada de toxinas y la eficacia de los antígenos obtenidos de las mismas.

BIBLIOGRAFIA

Dawson y Mauritzen (1968). Aust. J. Biol. Sci. t. 21; pág. 559.
 Happle (1968). Chem. Indust. pág. 670.
 Latham, Bent y Levine (1962). Appl. Microbiol., t. 10, pág. 146.
 Manzullo y Aizeno (1948). Semana Médica número 2.869, enero 1948.

Modern y Ruff (1949). Rev. del Instituto Malbrán, t. 14, Nº 1, pág. 180.
 Muller y Müller (1967). J. Bact., t. 6, pág. 580.
 Ramon, G. (1940). Rev. Immunol., t. 6, pág. 65.
 Raynaud, Tupin y Bizzini (1968). Progress. Immunobiol. Standard, t. 3.
 Sordelli, Modern y Ferrari (1936). Rev. Inst. Bact., V. VII, pág. 622.