

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DETOXIFICACIÓN DE LA TOXINA TETÁNICA

EVALUATION OF DETOXIFICATION CONDITIONS OF TETANUS TOXIN

Rodríguez C, Rojas J, Gutiérrez I¹.

RESUMEN

La transformación a toxoide de la toxina tetánica sin purificar y libre de células, se evaluó bajo condiciones variables de pH, temperatura de incubación inicial (primera semana), potencial de óxido-reducción, concentración de toxina tetánica y concentración de formaldehído. Al tratar la toxina tetánica en un medio de reacción neutro existe menor porcentaje de pérdida de la proteína tetánica. Para las condiciones actuales de detoxificación, no existe dependencia de la concentración de formaldehído y la concentración de proteína tetánica inicial, variando de forma independiente el valor floculante. La reacción formaldehído-toxina es lenta a bajas temperaturas, con menor disminución del valor floculante y sin influencia del potencial redox en el valor floculante y en la pérdida de toxicidad.

Palabras Claves: detoxificación, toxoide tetánico, toxina tetánica, formaldehído

SUMMARY

The transformation to toxoid of tetanus toxin without purification and cells free, was evaluated under variable conditions such as pH, initial incubation temperature (first week), potential of oxidation-reduction, tetanus toxin concentration and formaldehyde concentration. When tetanus toxin is treated in a neutral reactional media there is a less lost of tetanus protein. To the present detoxification conditions there is not dependence between the formaldehyde concentration and the initial tetanus protein concentration changing independently the flocculant value. The formaldehyde-toxin reaction is slow at low temperatures, with a lower diminution of the flocculant value and without the redox potential influence in the flocculant value and in the lost of toxicity.

Keywords : detoxification, tetanus toxoid, tetanus toxin, formaldehyde

INTRODUCCIÓN

El tétanos es una enfermedad aguda inducida por una exotoxina (tetanoespasmina), producida por el *Clostridium tetani*, cuya tasa de mortalidad varía entre 20 y 60%, presentándose la tasa más alta en recién nacidos, tétanos neonatal (Reyes y Flores, 1986 ; Shiavo et al., 1996). El tétanos se ha denominado "Enfermedad sin Excusas", ya que es completamente prevenible por vacunación y la Organización Mundial de la Salud ha puesto en funcionamiento un programa de vacunación masiva para eliminarla (Shiavo et al., 1996). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud es la entidad encargada de la producción del Toxoide Tetánico necesario para cubrir las necesidades del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). El toxoide se encuentra adsorbido en hidróxido de aluminio (Vacuna TT), asociado al Toxoide Diftérico (Vacunas Td y TD) y/o asociado a Toxoide Diftérico y a gérmenes muertos de *Bordetella pertussis* (Vacuna DPT).

El toxoide consiste en toxina tetánica detoxificada con formaldehído y calor, este hecho fue reportado por primera vez por Descomby en 1920, quien preparó el primer toxoide tetánico combinado (toxina con aldehído fórmico y calor) y demostró que podía estimular la formación de anticuerpos en animales de experimentación (Reyes y Flores, 1986). En 1926, Ramón comprobó este hecho, tras inocular toxoide tetánico en animales y en sí mismo e inducir un estado de inmunidad activa, además realizó la primera vacunación antitetánica en humanos, utilizando antitoxina tetánica, demostrando así el valor de la profilaxia tetánica (Reyes y Flores, 1986 ; Shiavo et al., 1996). En 1932 Velluz evaluó la concentración de formaldehído y pH en el proceso de detoxificación, encontrando una variación significativa en el valor floculante de la toxina (Cheyroux, 1954). El

¹ Laboratorio de Tétanos, Subdirección Industrial, Instituto Nacional de Salud. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.
lgutierrez@hemagogus.ins.gov.co

formaldehído actúa como un agente de entrecruzamiento, formando enlaces metilénicos intra e intermoleculares que resulta en polimerización, lo cual podría explicar la disminución en la actividad floculante específica (Fraenkel y Olcott, 1948). Según Murphy, esta polimerización es directamente proporcional a la concentración de proteína y de formaldehído, es decir que a mayor concentración de proteína mayor polimerización, mayor peso molecular del polímero obtenido y por ende mayor disminución en la actividad floculante, lo mismo sucede cuando se mantiene constante la concentración de proteína y se varía la de formaldehído. Murphy, analizó la formación de toxoide tetánico bajo diferentes condiciones, determinando que el producto de la reacción depende de la concentración de proteína y de formaldehído (Murphy, 1967). El valor floculante también se encuentra influenciado por el contenido de proteasas presentes en el medio de cultivo y su actividad depende de la temperatura de incubación (Amoureux, 1945).

En el presente trabajo se evaluó la influencia del pH, la concentración de formaldehído, la concentración de toxina tetánica y la temperatura de incubación inicial en el proceso de detoxificación utilizado actualmente en el Instituto Nacional de Salud y en el cual se reduce en un 30% la concentración de proteína (dada en Lfs¹ totales por mL), el cual se considera como porcentaje de pérdida en proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio la toxina empleada fue obtenida por cultivo estático, en jarros con 10 l de medio Latham-Mueller, incubados a 35°C por 7 días (Gutiérrez, 1995). Se utilizó la cepa de *Clostridium tetani* Massachussetts, la cual es altamente toxigénica y no esporula en condiciones normales de laboratorio. La toxina fue centrifugada en vénulas estériles a 4000 r.p.m. durante 30 minutos, en una centrífuga SORVALL RC3B. Los ratones empleados para la prueba de toxicidad son de la cepa NIH, con un peso de 18 a 20g, de aproximadamente 21 días de nacidos, suministrados por la División de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, los cuales son inoculados con 1 ml de la toxina tetánica en estudio y observados durante 28 días para detectar signos de tétanos. Para evaluar los diferentes ensayos se realiza la floculación de Ramón y Toxicidad en ratón de acuerdo al manual para la Producción y Control de Vacunas: Toxoide Tetánico (WHO, 1997).

Determinación del pH óptimo de reacción.

Se utilizaron una serie de frascos taparrosca de 250 ml, conteniendo 200 ml de toxina tetánica (70 Lf/ml), con un gradiente creciente de pH (entre 5.5 y 8.0) y 0.5% v/v de

formaldehído (comercial en solución al 37%, estabilizado con 10% de metanol!). Para obtener el nivel de pH deseado se utilizó NaH₂PO₄·2H₂O ó Na₂HPO₄·2H₂O y para mantenerlo se empleó buffer fosfato 0.1 M. Una vez se ajustó el pH, los frascos se incubaron a 37° C por 28 días, se tomó una muestra de 10 mL semanalmente para evaluar concentración de proteína tetánica (toxina o toxoide) mediante la prueba de floculación de Ramón y toxicidad en ratón (WHO, 1997). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Variación de la concentración de toxina tetánica y formaldehído.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de toxina tetánica: 20,40,60,80 y 100 Lf/ml, con un volumen de toxina de 200 mL en frascos taparrosca de 250 ml. Cada concentración de toxina se enfrentó a diferentes concentraciones de formaldehído, 0.3,0.35,0.4,0.45,0.5, 0.55,0.6,0.8,1.0 y 1.2 % v/v, en un pH de reacción de 7.0, valor óptimo determinado en el primer ensayo. Posteriormente se incubó a 37°C por 28 días en el transcurso de los cuales se tomó muestra a los 8,16,23 y 28 días, a las cuales se les realizó la prueba de floculación de Ramón y al día 28 toxicidad en ratón (WHO, 1997). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Variación de la temperatura de incubación inicial.

Para este estudio se empleó toxina tetánica (55 Lf/ml) adicionada con 0.5 % v/v de formaldehído a un pH de 7.0 y se sometió a diferentes temperaturas de incubación inicial (Amoureux, 1945). Se colectó un volumen de toxina de 200 mL en frascos de 250 ml, el frasco No 1 se incubó a una temperatura de 4°C por una semana, el frasco No 2 se mantuvo a una temperatura de 37°C por 28 días y el frasco No 3 se conservó por una semana a 22° C. Posteriormente los frascos 1 y 3 fueron incubados a 37° C hasta completar los 28 días de detoxificación, se tomó muestra a los 8,16, 23 y 28 días, a las cuales se les realizó las pruebas de floculación de Ramón y toxicidad en ratón (WHO, 1997). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Variación de la temperatura de incubación inicial con la presencia de oxígeno o nitrógeno en el medio.

La toxina tetánica (50 Lf/ml) fue detoxificada con 0.5% v/v de formaldehído a un pH de 7.0, a diferentes condiciones de óxido-reducción y temperatura de incubación inicial (Amoureux, 1945). La toxina fue repartida en frascos de 250 ml (200 ml por frasco) divididos en dos grupos, cada uno de los cuales contenía tres frascos. El primer grupo se burbujeó con oxígeno (O₂) durante 5 minutos y se cerraron los frascos herméticamente, posteriormente se incubaron a 4,22 y 37° C respectivamente durante una semana, al cabo de la cual se continuó la incubación a 37° C hasta completar 28 días de detoxificación. El segundo grupo se burbujeó con nitrógeno (N₂) durante 5 minutos y se cerraron los frascos herméticamente, posteriormente se incubaron en las mismas condiciones del primer grupo. El día 28 se

¹ Lf: Límite Floculante, cantidad de toxina o toxoide que mezclada con 1 UI de antitoxina flocula en el más corto tiempo (no superior a 60 minutos).

tomó muestra para realizar pruebas de floculación de Ramón y toxicidad en ratón (WHO, 1997). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

Correlación del pH frente a la proteína tetánica. Al evaluar la influencia del pH en el porcentaje de pérdida al día 28, se observó que los ensayos a pH 7.0 presentan una menor disminución en el título, con un porcentaje de pérdida de 28.5% y en los ensayos a pH 8.0 se presentó mayor pérdida con un porcentaje de 64.27%. (Figura 1).

En la prueba de toxicidad, al observar la distribución porcentual de mortalidad se encontró una mortalidad de 100% en el día 0, en todos los valores de pH; a partir del octavo día hasta el día 28 de detoxificación, la prueba de toxicidad fue satisfactoria para los valores de pH entre 5.5 y 7.0 puesto que el porcentaje de mortalidad fue de 0%. El valor de pH 7.5 presentó variaciones en el porcentaje de mortalidad durante los días de observación,

siendo la prueba no satisfactoria al día 28. Al observar el valor de pH 8.0 se encontró que tenía un porcentaje constante de mortalidad del 100% en todos los días de observación (Figura 2).

Variación de la concentración de toxina tetánica y de formaldehído.

En la Tabla 1 se presentan las observaciones al día 28 de detoxificación de las diferentes concentraciones de formaldehído frente a diferentes concentraciones de proteína inicial. La concentración inicial de 20 Lf/mL presentó mayor porcentaje de pérdida en las diferentes concentraciones de formaldehído y la de 80 Lf/mL mostró un comportamiento constante con menor porcentaje de pérdida. Además se observa una ligera tendencia en donde a mayor concentración de formaldehído mayor pérdida, pero no para todas las concentraciones de proteína. Al realizar la prueba de toxicidad ésta fue satisfactoria para las concentraciones de formaldehído iguales o mayores a 0.35% v/v, siendo 0.30% de formaldehído no satisfactoria con 100% de mortalidad (Figura 3).

Tabla 1. Porcentaje de pérdida de diferentes concentraciones de proteína tetánica sometidas a proceso de detoxificación con concentraciones variables de formaldehído durante 28 días a 37°C

FORMOL %	% DE PERDIDA				
	20 Lf/ml	40 Lf/ml	60 Lf/ml	80 Lf/ml	100 Lf/ml
0.30	75	30	35	18.7	30
0.35	75	25	40	26.2	24
0.40	70	27.5	35	21.2	26
0.45	75	27.5	26.6	26.2	25
0.50	70	65	16	25	20
0.55	70	45	23.3	23.7	25
0.60	70	32.5	41.6	25	37
0.80	75	30	41.6	17.5	36
1.00	90	37.5	35	26.2	45
1.20	90	37.5	41.6	20	48

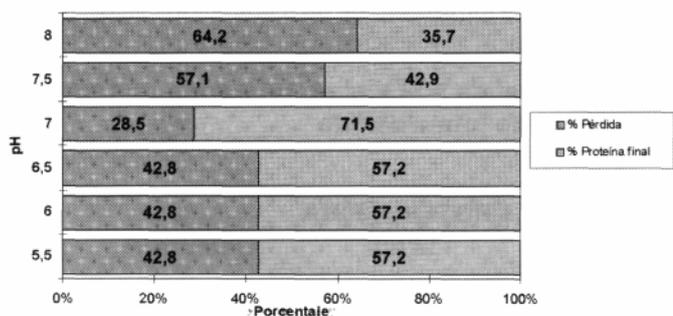


Figura 1. Distribución porcentual de pérdida de una proteína tetánica inicial de 70 IF/rnL, 37°C de temperatura y 28 días de incubación.

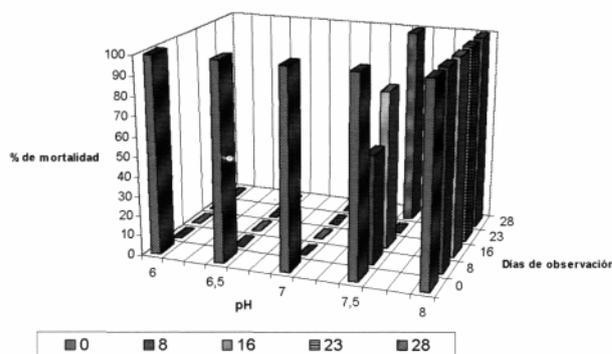


Figura 2. Distribución porcentual de mortalidad según pH y días de observación, proteína inicial 70 Lf/mL, temperatura 37°C

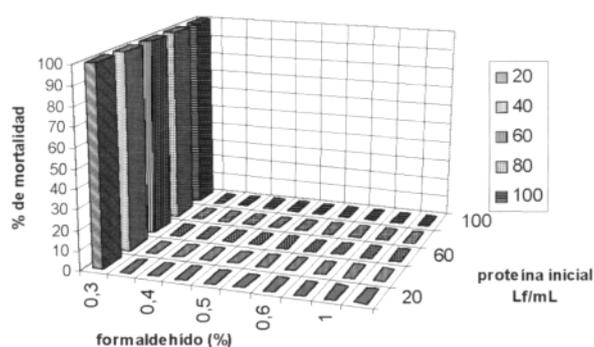


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de diferentes concentraciones de proteína tetánica detoxificada con diferentes concentraciones de formaldehído al día 28

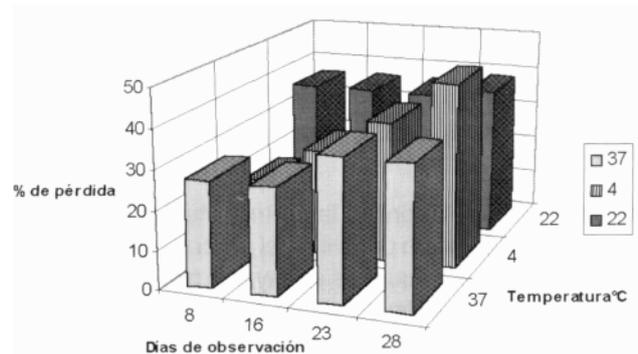


Figura 4. % de pérdida a diferentes temperaturas de incubación inicial durante 28 días de observación, pH 7.0, 0.5 % de formaldehído

Tabla 2. Porcentaje de pérdida de una proteína tetánica sometida al proceso de detoxificación a diferentes temperaturas de incubación inicial durante 28 días a 37°C y 0.5 % de formaldehído

	4°C		22°C		37°C	
	PROTEIN A Lf/ml	% PERDIDA	PROTEIN A Lf/ml	% PERDIDA	PROTEIN A Lf/ml	% PERDIDA
Día 0	55	0	50	0	55	0
Día 8	45	18	32	36	40	27
Día 16	40	27	32	36	40	27
Día 23	35	36	32	36	35	36
Día 28	29	47	31	38	35	36

Variación de la temperatura de incubación inicial.

La toxina incubada inicialmente a 4°C presentó menor pérdida (13.5%), a la primera semana de incubación y al completar el tiempo de detoxificación se presentó menor porcentaje de pérdida en la toxina incubada a 37°C (36.3%) y un mayor porcentaje de pérdida en 4°C (47.27%), como se observa en la tabla 2 y la figura 4.

Al evaluar la distribución porcentual de mortalidad en la prueba de toxicidad, se observa un 100% de mortalidad para el día 8 a las temperaturas iniciales de 4°C y 37°C, mientras que la de 37°C presentó 0% de mortalidad. A partir del día 15 no

se presentó mortalidad en ninguna de las temperaturas de incubación inicial, siendo la prueba satisfactoria.

Variación de la temperatura de incubación inicial en presencia de oxígeno o nitrógeno en el medio.

Al evaluar la concentración de la proteína tetánica con la temperatura en presencia de oxígeno y nitrógeno no se encontró influencia sobre el título (porcentaje de pérdida entre 40 y 44%), (Tablas 3, 4 y Figura 5). Al realizar la prueba de toxicidad a los 28 días de detoxificación, fue satisfactoria tanto para el oxígeno como para nitrógeno a las diferentes temperaturas de incubación inicial.

Tabla No 3. Porcentaje de pérdida de una proteína tetánica Inicial de 50 Lf/ml en presencia de Oxígeno, detoxificada por 28 días a 37°C y 0.5 % de formaldehído

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN INICIAL	PROTEINA FINA Lf/ml	% PERDIDA
4 °C	29	42
22 °C	29	42
37 °C	29	42

Temperatura de incubación inicial	Proteína fina Lf/ ml	% Perdida
4°C	29	42
22°C	29	42
37°C	29	42

Tabla No 4. Porcentaje de pérdida de una proteína tetánica inicial de 50 Lf/ml en presencia de Nitrógeno, detoxificada por 28 días a 37°C y 0.5 % de formaldehído

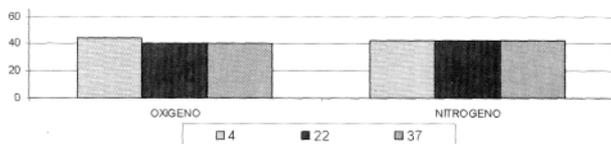


Figura 5. Comparación entre proteína tetánica final y temperatura de incubación inicial según presencia de oxígeno o nitrógeno en el medio al día 28 de observación

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al variar el valor de pH se encontró que entre más alcalino el medio, hay una tendencia a aumentar la pérdida de concentración de proteína tetánica. Estos resultados corresponden con los obtenidos por Cheyroux en 1954, quien afirma que cuando el pH es más alcalino, la fijación de formaldehído es más rápida, disminuyendo de manera considerable el valor floculante, además afirma que un pH alcalino activa la detoxificación; sin embargo en los ensayos realizados a un valor de pH de 7.5 y 8.0 la toxina tetánica no detoxificó, probablemente porque la reacción de formaldehído-toxina no es estable.

El formaldehído afecta el porcentaje de pérdida, disminuyendo la concentración de proteína tetánica en el proceso de detoxificación, observándose una ligera tendencia en donde a mayor concentración de formaldehído mayor pérdida, pero no para todas las concentraciones de proteína tetánica utilizadas. La variabilidad de los resultados se debe posiblemente a la presencia de otras proteínas en el medio que pueden participar en la reacción formaldehído-toxina y por lo tanto afectar de manera considerable la especificidad de la reacción. Cuando se detoxifica toxina no purificada, como en este caso, la cantidad de formaldehído necesaria para detoxificar no

depende de la concentración de formaldehído ni toxina inicial, lo contrario sucede cuando se utiliza toxina purificada. Murphy demostró que la concentración de formaldehído necesaria para detoxificar una toxina purificada es directamente proporcional a la concentración de toxina inicial, pudiéndose obtener una concentración de formaldehído para cada concentración de toxina inicial en donde la disminución del valor floculante sea mínima sin afectar la estabilidad del toxoide.

Cuando se somete la toxina tetánica a detoxificación a 4°C no se disminuye de manera considerable el valor floculante debido a que la acción del formaldehído es lenta o posiblemente debido a que las proteasas tienen una baja actividad a esta temperatura. La toxina detoxificada a 37°C mostró disminución considerable del valor floculante debido probablemente a que aumenta la acción del formaldehído y de las proteasas, ratificando así lo expuesto por Cheyroux. Sin embargo, la acción del formaldehído fue insuficiente a los ocho días de incubación a temperaturas de 37° y 4°C, pero a 22°C su acción fue satisfactoria. Estos resultados muestran que existe influencia de la temperatura en la detoxificación, ya sea en la reacción formaldehído-toxina o en la actividad de las proteasas; es necesario realizar un estudio más detallado, para evaluar si esta influencia es significativa o no.

En todos los ensayos, cuya prueba de toxicidad fue satisfactoria, se observó que la detoxificación ocurría entre el día 8 y el día 15, teniendo en cuenta que la correlación entre el tiempo de observación y el porcentaje de pérdida es representativa, se puede suponer que la disminución en el tiempo de incubación conlleva a disminución en el porcentaje de pérdida. De lo anterior se desprende otro trabajo en el cual se estudiará la influencia del tiempo de incubación en el porcentaje de pérdida.

CONCLUSIONES

Al detoxificar la toxina tetánica en un medio de reacción neutro (pH 7.0), el rendimiento en términos de producción mejora debido a que hay un menor porcentaje de pérdida de la proteína tetánica. En un medio alcalino (pH 7.5 - 8.5), no existe reacción óptima entre la toxina tetánica y una concentración de formaldehído 0.5% v/v.

En las condiciones actuales de producción del toxoide tetánico en el Instituto Nacional de Salud, no existe relación entre la concentración de formaldehído y la concentración de toxina tetánica inicial para llevar a cabo la detoxificación, requiriéndose no menos de 0.35% v/v de formaldehído sin tener en cuenta la concentración de toxina tetánica inicial (dada en Lf/mL).

Una toxina incubada a 4°C presenta reacción lenta con formaldehído, mientras que incubada a 37° y 22°C la reacción siempre es activa.

El potencial de óxido reducción en el medio de reacción no influye en el valor floculante ni en la pérdida de toxicidad de la proteína tetánica.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Salud como entidad que auspició la investigación, al Dr. José Manuel Granados por su colaboración y orientación al grupo de DPT y a la División de Animales de Laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Amouraux G. 1945. Partes et toxine tétanique. *Séance*. 139.252-64.

Cheyroux M. 1954. Toxine tétanique et formol. *Annales de L'Institut Pasteur*. 86. 356-68.

Fraenkel Conrat, Olcott H. 1948. Reaction of formaldehyde with proteins. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. *Journal of Bacteriology*. 48. 827-43.

Gutiérrez I. 1995. Manual de producción del toxoide tetánico a granel. Grupo de Tétanos del Instituto Nacional de Salud. Santafé de Bogotá. 62.

Murphy S. 1967. Effect of protein and formaldehyde concentration on toxoid formation. *Journal of Bacteriology*. 94. 3. 586-9.

Rayes E., Flores M. 1986. Tétanos. *Manual Moderno*. México. 154.

Schiavo G., Rosaetto O., Monteucco C. 1996. Bases Moleculares del Tétanos y del Botulismo. *Investigación y Ciencia*. Marzo. 46-55.

World Health Organization. 1997. Manual for the Production and control of vaccines: Tetanus Toxoid. 20-100.

World Health Organization. 1994. Production and control of Tetanus vaccine. Module IV. 14-18

World Health Organization. 1994. Module V. 14-16.