



EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN Y DE LA CONCENTRACIÓN DE FORMALDEHÍDO EN LA DETOXIFICACIÓN DE LA TOXINA TETÁNICA

Martha Céspedes¹, Sonia Díaz¹, Ivonne Gutiérrez² y Janeth Arias¹

¹ Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.
Carrera 7ª No. 43 - 82. Edificio Félix Restrepo oficina 111. Santafé de Bogotá.

² Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Tétanos.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas para la detoxificación de la toxina tetánica. Se realizaron un total de 12 ensayos, 6 por lote de toxina (TT003 y TT007), donde se evaluaron tres concentraciones de formaldehído (1%, 1.5% y 2%) y dos condiciones de agitación (sin agitación y agitado a 100 r.p.m), todos los ensayos se realizaron por duplicado; estos datos se analizaron por medio de un diseño estadístico (varianza). A partir del día 7 dejó de ser mortal la toxina tetánica para los ratones, al 1.5% de formaldehído presentó menor pérdida del título con respecto a las otras dos concentraciones; en cuanto a la agitación no presentó diferencia significativa con respecto a la condición sin agitar, pero presentando mayor respuesta en agitación. Después de haber controlado todas estas condiciones se determinó que sí son reproducibles a escala industrial, esto se verificó realizando cuatro pruebas de control de calidad (esterilidad, potencia, toxicidad y reversión). Se encontró que las condiciones óptimas para la detoxificación fueron al 1.5% de formaldehído, en agitación constante y por un tiempo de 21 días.

Palabras clave: Toxina tetánica, detoxificación, formaldehído, título, agitación.

ABSTRACT

The study's objective was to determinate the optime conditions to make detoxification the tetanus toxin. A total of 12 test (6 by each lot of the TT003 and TT007 toxin), where three different concentrations of formaldehyde were evaluated (1%, 1.5% and 2%), and two agitation conditions (without and with agitation at 100 r.p.m). All tests were made by duplicate; and the data was analized through statistics design (variance). Starting on the 7th day the tetanus toxin ceased to be mortal for the mice, at 1.5% of formaldehyde it showed less lost of the title in relation to the other 2 concentrations; from the agitation stand point, there was not significant difference with the agited one, although the answer was better in this last one. After having controlled all these conditions, it was determinated that they can be reproduced on a industrial scale; it was verifed through 4 quality control test (sterility, potency, toxicity and reversion). It was found that the optime conditions for the detoxification was 1.5% formaldehyde in constant agitation for a 21 days period.

Key words: tetanus toxin; detoxification; formaldehyde; title; agitation.

El tétanos es una enfermedad infecciosa (tetanospasmia) producida por el aguda que sigue causando víctimas en el mundo, esta es causada por una exotoxina *Clostridium tetani*. Aunque es una enfermedad prevenible por medio de vacuna-

ción sigue siendo un factor importante de mortalidad en la población, la tasa de prevalencia varía del 20 al 60%, considerándose como la tasa más alta encontrada en recién nacidos y ancianos (Gutiérrez I, 2000).

El *Clostridium tetani* es un bacilo Gram positivo, estrictamente anaerobio y no invasivo, es móvil (flagelado) y forma endosporas fácilmente, la cual es la forma infectante (figura 1). Este microorganismo habita en las capas superficiales del suelo, en heces de animales y en ambientes hospitalarios; penetrando al organismo por medio de heridas cortopunzantes, en infecciones por aborto, quemaduras, etc.



FIGURA 1. Micrografía del *Clostridium tetani*

Estas lesiones tisulares, hacen que las enzimas y bacterias aeróbicas localizadas en el sitio de la lesión capten la mayor parte de oxígeno, promoviendo la aparición de un medio anaerobio adecuado para el establecimiento y reproducción del *Clostridium tetani*. La toxina es codificada por el DNA plasmídico de la bacteria, y producida por ésta principalmente en su período de crecimiento, liberándola por un proceso de autólisis. La toxina tetánica es una haloproteína termolábil, de peso molecular 150.000 Daltons. Se presenta en dos formas moleculares diferentes: la forma intracelular es una cadena única dentro

de la bacteria, la extracelular se produce fuera de la misma a partir del clivaje de la forma intracelular por acción de proteasas, produciendo una cadena pesada (H) de 100.000 Daltons y una cadena liviana (L) de 50.000 Daltons, unidas por un enlace disulfuro (Schantz y Jonson, 1992). La cadena (H) es responsable de la unión neuroespecífica y de la entrada de la cadena liviana dentro del citosol neuronal causando la enfermedad (Herreros, J. et al., 2000). Esta toxina se convierte en toxoide mediante un proceso de detoxificación, por medio de un tratamiento químico con un agente detoxificante. Algunos autores, encontraron que el formaldehído era capaz de transformar ciertas toxinas bacterianas en productos atóxicos que conservan sus propiedades inmunogénicas (Murphy, S., 1967). Esta reacción involucra la pérdida de toxicidad sin afectar los determinantes antigénicos que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes. Posteriormente, en 1924 otro autor preparó el primer toxoide tetánico combinado (toxina tratada con formaldehído y calor) y pudo demostrar que la administración de tres dosis a conejos con intervalos mensuales llevaba a la aparición de antitoxina tetánica en sangre de estos animales (Murphy, S., 1967). Por el mismo se aplicaron los primeros toxoides tetánicos con fines profilácticos en el hombre (Nielsen, K.E., 1965).

Se han planteado varias hipótesis para determinar el mecanismo por el cual la toxina pierde su toxicidad:

Ocultamiento de las regiones de expresión tóxica por causa de la formación de enlaces metilénicos entre los aminoácidos lisina y tirosina o histidina, bloqueo de los grupos amino de la lisina, cambios conformacionales originados por la formación de tales enlaces y por la cooperación de los mecanismos anteriores (Rodríguez, C., et al, 1997).

El proceso de detoxificación sucede en dos etapas. La primera rápida y fácilmente reversible y la segunda más lenta e irreversible (10). (Figura 2)

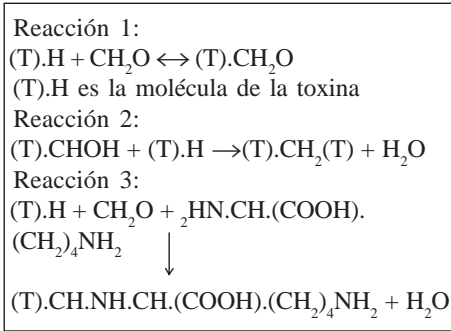


FIGURA 2. Mecanismo de reacción entre la toxina y formaldehído.

Teniendo en cuenta que la enfermedad causada por el *Clostridium tetani* es un problema de salud, y que es poca la información acerca de la detoxificación de la toxina para la producción de la vacuna. Se propuso realizar esta investigación con el fin de determinar el porcentaje de formaldehído según tiempo de incubación y nivel de agitación en la detoxificación de la toxina tetánica, comprobar a escala industrial las condiciones de detoxificación establecidas en la etapa anterior y verificar la calidad del toxoide obtenido, de acuerdo con los estándares obtenidos por la OMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio la toxina empleada se obtuvo a partir de un liofilizado de la cepa de *Clostridium tetani* Massachusetts, suministrada por el laboratorio de tétanos del Instituto Nacional de Salud (INS). Igualmente se emplearon ratones exógenicos de la cepa (NIH) del National Health Intitute de Estados Unidos, con un peso de 18 - 20

g y 21 días de nacidos aproximadamente. Las pruebas de control de calidad se realizaron empleando cobayos de la cepa Hartley, con un peso entre 250 - 350 g. Se realizó un diseño experimental factorial, para 6 ensayos por cada lote, teniendo en cuenta dos variables: porcentaje de formaldehído y agitación, estos ensayos fueron realizados por duplicado. Como variables de respuesta se tomaron el título (Lf/mL) y el porcentaje de mortalidad.

TABLA 1. Ensayos realizados para un lote de toxina tetánica

Nº Ensayos	Temperatura	Ph	Agitación	%	
				Concentración de formaldehído	
1	37°C	7.0	100 rpm	1	
2	37°C	7.0	100 rpm	1	
3	37°C	7.0	Sin agitar	1	
4	37°C	7.0	Sin agitar	1	
5	37°C	7.0	100 rpm	1.5	
6	37°C	7.0	100 rpm	1.5	
7	37°C	7.0	Sin agitar	1.5	
8	37°C	7.0	Sin agitar	1.5	
9	37°C	7.0	100 rpm	2	
10	37°C	7.0	100 rpm	2	
11	37°C	7.0	Sin agitar	2	
12	37°C	7.0	Sin agitar	2	

Para determinar la concentración de formaldehído, tiempo de incubación y nivel de agitación en el proceso de detoxificación de la toxina tetánica, se realizaron un total de 24 ensayos y se evaluaron tres concentraciones de formaldehído (al 1%, al 1.5% y al 2%) y dos condiciones de agitación logradas por el sistema de aspapas del fermentador. (Sin agitación y agitado a 100 rpm). La tabla 1 muestra los parámetros de los ensayos realizados por lote de toxina tetánica a diferentes concentraciones de formaldehído y condiciones de agitación.

Para realizar estos ensayos se utilizaron dos de los cinco lotes obtenidos en el fermentador Pilot P 100 litros del laboratorio de tétanos del INS, con burbujeo de N₂ y aireación superficial. Para cada lote se tomaron 5 litros de toxina a los cuales se les ajustó el pH a 7.0 con una solución de NaOH al 40% o HCl al 18.5%, según el caso, este pH se mantuvo constante usando una solución buffer de fosfatos. A partir de la solución stock (5 L de toxina) se tomaron alícuotas de 200 mL en 12 frascos Schott tapa rosca y se les adicionó 2 mL (1%) de formaldehído a los frascos 1, 2, 3 y 4; 3 mL (1.5%) a los frascos 5, 6, 7, y 8 y 4 mL (2%) a los frascos 9, 10, 11 y 12. Las soluciones fueron incubadas a 37°C por 28 días, dos frascos de cada concentración sin agitación y los otros dos en una incubadora con shaker de agitación a 100 rpm. Durante la incubación se tomó una muestra de 10 mL de cada frasco, a los 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días, se determinó el título en Lf/mL, DML para el día 0 y la prueba de toxicidad inespecífica. Este mismo procedimiento se realizó para el otro lote de toxina obtenida en las mismas condiciones, para un total de 24 ensayos.

Se tomaron los tres lotes restantes de las cinco fermentaciones realizadas como se explicó anteriormente y se inició la detoxificación ajustando el pH a 7.0 (el cual se mantuvo constante usando soluciones buffer fosfatos) y adicionando el 1.5% de formaldehído para cada lote y en constante agitación a 100 rpm a 37°C durante 28 días, se tomó un volumen inicial de 4000 ml para dos de los lotes y 3800 ml para el lote restante.

Al terminar el proceso de detoxificación se tomó muestra (20 mL) de cada uno de los lotes para verificar el porcentaje de pérdida medido en Lf/mL por medio de la prueba de Ramon (10) y se midió el volumen final el cual se pasó a un jarro de precipita-

do, se le adicionó el 10% de sulfato de amonio a cada lote para que precipitaran, se agitó por 30 minutos en el agitador de hélice, se centrifugó por 50 minutos en la centrifuga refrigerada IEC, se midió nuevamente el volumen de cada lote y se le adicionó el 26% de sulfato de amonio, se agitó por 30 minutos y se centrifugó por 50 minutos más. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se reconstituyó en un litro de solución salina. Se tomó muestra del sobrenadante, antes de la diálisis, después de la diálisis, clarificado y esterilizado para cada lote, en cada etapa se utilizó un filtro de 0.22 µm, estas muestras se titularon para verificar el porcentaje de pérdida en cada etapa del proceso.

Se realizaron cuatro pruebas teniendo el toxoide ya purificado: Prueba de toxicidad, se tomó como base el título obtenido después de la detoxificación se preparó 10 mL con 500 Lf/mL, para inocular 1 mL en cada cobayo por lote, con un período de observación de 21 días. La Prueba de potencia se preparó con 100 mL de vacuna según su título para cada lote, inoculando 1 mL vía subcutánea a cada cobayo y se observó por 45 días. Para la prueba de reversión, se prepararon 300 mL por lote teniendo en cuenta el título de cada uno; de estos 300 mL, se tomaron alícuotas de 100 mL en frascos Schott y se mantuvieron a tres temperaturas diferentes (4°C, 20°C y 37°C) por lote, se inocularon 5 mL del toxoide para cada cobayo y se observaron por 21 días. Para la prueba de esterilidad se tomaron 5 mL del toxoide tetánico, se sembró 1 mL de muestra estéril en cada uno de los cuatro tubos de medio de cultivo (2 de tripticasa de soya y 2 de tioglicolato fluido) y posteriormente se incubaron los tubos con tioglicolato a 25°C y los de tripticasa de soya a temperatura ambiente; estos tubos se observaron los 4 primeros días y luego a intervalos regulares por 10 días más.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Para hacer el análisis estadístico de los datos se usó la herramienta estadística SAS versión 6.12, para todas las variables respuesta se hizo un análisis de varianza y se aplicó la prueba de Scheffe para determinar si entre los niveles de cada factor hay diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del porcentaje de formaldehído, tiempo de incubación y nivel de agitación

Con los resultados de los dos lotes trabajados (TT003 y TT007), se graficó tanto el porcentaje de pérdida del título como de mortalidad a las diferentes concentraciones de formaldehído para cada lote, observándose un comportamiento similar entre los lotes; permitiendo promediar los valores de pérdida del título (tabla 2) y posteriormente graficarlos (figura 3).

Al examinar la figura 3 se observa que para el 1% de formaldehído se presenta una menor disminución del título al día 14 (agitado 20.25% y sin agitar 21.75%), en relación al día 28 que se incrementa la pérdida (agitado 29.75% y sin agitar 31%). Según la estadística esta concentración de formaldehído presenta una menor respuesta con respecto a las otras condiciones ya que se evidencia una diferencia significativa ($P > 0.0001$).

TABLA 2. Promedio del porcentaje de pérdida de los lotes TT003 y TT007

Condición	% de pérdida día 14	% de pérdida día 21	% de pérdida día 28
1% formald. agitado	20.25	25.25	29.75
1% formald. sin agitar	21.75	26.25	31
1.5% formald. agitado	24.25	30.5	37.75
1.5% formald. sin agitar	25.5	30.25	37.5
2% formald. agitado	30	37.5	45
2% formald. sin agitar	27.5	32.5	41.25

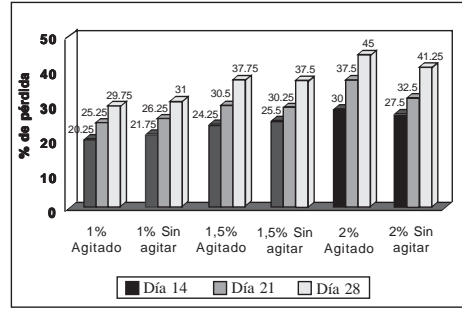


FIGURA 3. Porcentajes de pérdida promedio de los lotes TT003 y TT007.

En cuanto al 1.5% de formaldehído se puede decir que al día 28 presentó un mayor porcentaje de pérdida (agitado 37.75% y sin agitar 37.5%) con respecto al día 14 que presentó una menor disminución del título floculante (agitado 24.25% y sin agitar 25.5%); siendo esta concentración la que según el estadístico de prueba formula dos grupos entre los cuales sí hay diferencias significativas ($P > 0.0001$), pero no dentro de cada uno de ellos, los grupos corresponden a:

- 2% y 1.5%
- 1.5% y 1%

por este motivo se escogió esta concentración de formaldehído (1.5%) ya que se encuentra en los dos grupos y presenta menor pérdida del título con respecto al 2% de formaldehído.

Con respecto al 2% de formaldehído se halló que para el día 28 la pérdida de título fue más alta (agitado 45% y sin agitar 41.25%), mientras que para el día 14 disminuyó el título floculante (agitado 30% y sin agitar 27.5%); se puede apreciar que en esta concentración hay una mayor pérdida del título con respecto a las otras concentraciones.

En cuanto a la pérdida de toxicidad a partir del día 7 dejó de ser mortal la toxina para los ratones y según The World Health

Organization 1997, se debe dejar 10 días más para asegurar la formación del polímero y su estabilidad. Por lo tanto se llega a un total de 17 días quedando éste entre los días 14 y 21 (estos estudios se realizaron con intervalos de tiempo), escogiendo para mayor seguridad un tiempo de 21 días para la detoxificación. Según el análisis de varianza el menor porcentaje de pérdida para las dos condiciones se evidenció en el día 14 sin mostrar diferencia significativa con respecto al día 21 ($P > 0.0001$), ya que al día 28 sí presenta diferencia significativa porque hay mayor pérdida del título ($P > 0.0001$).

Según la literatura citada; autores como: Bizzini, Turpin y Rainaud en 1974 aseguraron que la detoxificación ocurre dentro de un período de 54 horas, y la disminución total de la actividad tóxica se logra en el quinto día; al igual que Quigley¹ quien expuso que al prolongar el tiempo de incubación por 10 días más se consigue una detoxificación irreversible. Contrario a lo descrito por Nielsen *et al.*, que consideraron el día 21 como tiempo final para el proceso de detoxificación. Estos autores consideraron en promedio 15 días para el proceso, mientras que en este estudio se llegó a la determinar que se necesitaban 21 días para una detoxificación completa, siendo estos datos similares a los obtenidos ya que resultaron 17 días, mostrando una diferencia de 2 días con respecto a lo obtenido por los anteriores autores, sin embargo, por mayor seguridad se dejaron 21 días.

Con respecto a la concentración de formaldehído Rodríguez y Rojas, en 1997, trabajaron con una concentración de 0.5% en cultivo estático y sin purificar; siendo

ésta muy baja con relación a la que se utilizó en este trabajo que fue del 1.5%, con la diferencia que esta toxina estaba previamente purificada, en mayor concentración y en constante agitación; presentando menor pérdida del título, lo cual se relaciona con lo que expuso Murphy 1967, que al utilizar una toxina purificada hay una alta correlación entre la concentración de formaldehído utilizado para detoxificar y la concentración de proteína tetánica.

Comprobación a escala industrial de las condiciones de detoxificación establecidas en la etapa anterior.

Después de haber trabajado con las condiciones obtenidas en la etapa anterior se encontró que los porcentajes de pérdida promedio de los lotes iniciales (TT003 y TT007) presentan una pérdida del título menor con respecto a los lotes TT011, TT012 y TT013, sin embargo se evidencia similitud entre los lotes trabajados, como se puede observar en la figura 4. Teniendo en cuenta que los ensayos de las pruebas piloto se realizaron con un volumen de 200 ml, mientras que los volúmenes utilizados en los lotes TT011, TT012 y TT013 fueron de 4000 ml siendo este el volumen resultante de 80L después de haber realizado todo el proceso de purificación descrito en la metodología; asumiendo esto y observando la escasa diferencia en los porcentajes de pérdida con respecto a los ensayos piloto, se obtiene que estas condiciones sí pueden ser reproducibles a escala industrial, ya que también se controló el pH a 7.0, al igual que la temperatura a 37°C, dando buenos resultados como se puede comprobar con las pruebas biológicas, las cuales se analizarán más adelante.

1 Duarte Castañeda, Marcela y Muñoz Buitrago, Zulma Johanna. *Evaluación del tiempo y temperatura de incubación en la detoxificación de la toxina tetánica*, Bogotá, 1999, 65 p.

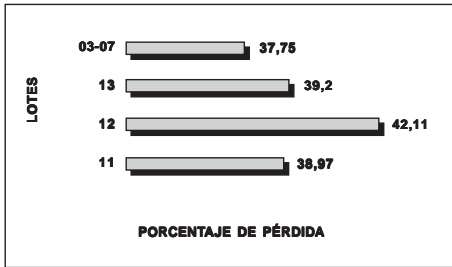


FIGURA 4. Comparación del porcentaje de pérdida del promedio de los lotes 03 y 07, con respecto a los lotes trabajados a escala industrial.

Verificación de la calidad del toxoide obtenido, de acuerdo a los estándares establecidos por la OMS.

Se realizó la Prueba de esterilidad para verificar la calidad del toxoide y con esta prueba se observó que el toxoide se encontraba estéril ya que no se evidenció crecimiento microbiano lo cual indicó que esta prueba fue satisfactoria.

Con respecto a la Prueba de toxicidad los cobayos de los lotes TT011 y TT012 sobrevivieron, evidenciando que la toxina pasó a ser toxoide, mientras que el lote TT013 mostró ser tóxico ya que los cobayos presentaron síntomas de tétanos, sin poder sobrevivir el 80% de la población, lo cual indicó que para este lote la prueba no fue satisfactoria. Esto lleva a sugerir que se debe aumentar el tiempo de detoxificación para asegurar la estabilidad del polímero.

Para la Prueba de reversión se utilizaron tres temperaturas (4°C, 20°C y 37°C) durante 45 días, presentándose una respuesta satisfactoria por parte de los cobayos ya que no presentaron pérdida de peso ni síntomas de intoxicación tetánica. Esto quiere decir que al someter el toxoide a diferentes temperaturas no pierde su estabilidad, y según la Farmacopea americana es el período de tiempo durante el cual un

producto retiene, dentro de los límites especificados y de principio a fin de su tiempo de almacenamiento y uso (vida útil), las mismas propiedades y características que poseía en el momento de su manufactura.

Y por último la Prueba de potencia, en la primera parte de esta prueba (inmunización) los cobayos no perdieron peso hasta el último día de evaluados para proseguir con la sangría a los 45 días de inoculados con el toxoide tetánico, y posteriormente continuar con la L+10 en la cual se obtuvo un título de 5.6571 UI/mL para los tres lotes (TT011, TT012 y TT013), esto quiere decir que sí cumple con la norma requerida ya que lo mínimo para la vacuna tetánica es de 2 UI/mL.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el tiempo de detoxificación se encontraba entre los días 14 y 21.
- Con la condición agitada no se halló una diferencia significativa con respecto a la no agitada, sin embargo, la condición agitada presentó un mayor nivel de respuesta.
- Se encontró que la toxina detoxificaba con una concentración de formaldehído del 1.5%.
- Se determinó que al trabajar con una toxina purificada la pérdida del título es menor.
- Las condiciones que se establecieron fueron reproducibles a escala industrial.
- Al realizar la prueba de toxicidad para los tres lotes (TT011, TT012 y TT013), el único que resultó ser tóxico fue el lote TT013, lo cual nos indica que no alcanzó a detoxificar en el tiempo establecido (21 días).

LITERATURA CITADA

- BIZZINI BERNARD, TURPIN ANDRÉ et RAYNAUD MARCEL. Etude sur le mecanisme de la detoxification des toxines proteiques par le formol. En: *Biochemie*, nov. 1968, (115): 881-897.
- CÉSPEDES MARTHA y DÍAZ SONIA. *Evaluación de la influencia de la agitación y de la concentración de formaldehído en la detoxificación de la toxina tetánica*. Trabajo de grado (Bacteriología y Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, 2001, 90 p.
- Department of Health and Human Services, Proceedings of an informal consultation on the World Health Organization requirements for Diphtheria, tetanus, pertusis and combined vaccines. USA. Manclarck editor. 1991, 288.
- Disponible en internet en versión HTML en: <http://www.tusalud.com.mx/120604.htm>
- GUTIÉRREZ, IVONNE. *Estudio comparativo entre las cepas de Clostridium tetani: Harvard, Massachusetts y Caracas para la producción de toxina tetánica en un fermentador de 5L*. Trabajo de maestría (Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, 2000, 87 p.
- HERREROS JUDIT, LALLI GIOVANNA y SCHIAVO GIAMPIETRO. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. En: *Biochemical Society*. Great Britain, N° 1 abril 2000, (347): 199-204.
- MURPHY, SAMUEL. Tetanus toxin and antigenic derivates: effect of protein and formaldehyde concentration on toxoid formation. En: *Journal of Bacteriology*, No. 3 sept. 1967, (94): 586-587.
- NIELSEN, K.E. Growth and toxin production by *Clostridium tetani*. En: *Immunobiol*, 1965 (3): 207-216.
- RODRÍGUEZ CLAUDIA, ROJAS JANETH. *Evaluación de la influencia del pH y concentración de formaldehído en la disminución del valor floculante de la toxina tetánica en el proceso de detoxificación*. Tesis de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias Bogotá. 1997, 81 p.
- SALLERAS LL Y VIDAL J. Vacuna antitetánica, En: *Vacunas sistemáticas y no sistemáticas*. Capítulo 6, 1998, 95-105.
- SCHANTZ y JONSON. Neurotoxins in Medicine. En: *Microbiological Reviews*. 1992, (56): 89-94.

Recibido: 29/02/2003

Aceptado: 6/08/2003