

Universitas  
**Scientiarum**

ISSN 0122-7483

Vol. 7 No. 1

Enero - Junio 2002



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**Revista de la Facultad de Ciencias**



## EVALUACIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN EL PROCESO DETOXIFICACIÓN DE UNA TOXINA TETÁNICA

Marcela Duarte<sup>1</sup>, Johana Muñoz<sup>1</sup>, Ivón Gutiérrez<sup>2</sup>, Janeth Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7ª N°. 43-82 Bogotá D.C., Colombia.

Janeth Arias P. E-mail: jdcarias@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratorio Producción de Tétanos. Instituto Nacional de Salud. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias.

### RESUMEN

Con el fin de disminuir el tiempo y la temperatura de incubación en el proceso de detoxificación de la Toxina Tetánica, se evaluaron diferentes tiempos y temperaturas de incubación; tomando cosechas en proceso del laboratorio de Producción de Tétanos del Instituto Nacional de Salud INS. Para determinar el día exacto de detoxificación se estableció un modelo logístico que involucró la estimación de la temperatura. La toxina se incubó a 4, 22 y 37°C, posteriormente se verificaron las características físico-químicas (pH), biológicas (Lf/mL, toxicidad inespecífica, específica y antigenicidad) del toxoide obtenido. Las mejores condiciones para el proceso son: 25 días de incubación a 37°C. Con las características citadas anteriormente se obtiene al año una ganancia de 1'513.350 dosis, que representan en dinero un ahorro anual de \$37'833.750 en la producción de la vacuna tetánica.

**Palabras clave:** *Clostridium tétani*, Detoxificación, floculación, tétanos, toxina.

### ABSTRACT

In order to reduce the incubation time and temperature in the Tetanic Toxin detoxification process, different times and temperature were evaluated; taking crops in process that were grown in tetanus Lab production of the National Institute of Health. To determine the exact day of detoxification a logistic model was established. The toxin was incubated at 4, 22 and 37°C to estimate the optimum temperature. Then the physical-chemical characteristics like (pH), and the biological characteristics (Lf/mL, unspecific, specific toxicity and antigenicity) of the toxoid were verified. The best conditions for the process are: 25 days of incubation at 37°C.

With the characteristics above, yearly there is a possibility to get a profit of 1.513.350 doses that represent \$37.833.750 for the production of the Tetanic Toxin.

**Key words:** *Clostridium tétani*, Detoxification, Flocculation, Tetanus, Toxin.

### INTRODUCCIÓN

*Clostridium tétani*, es el agente causal del tétanos, cuyo principal reservorio es el intestino de los seres humanos y animales, también se encuentra en la tierra en forma de esporas debido a la contaminación con heces fecales, en el polvo casero y en toda clase de productos contaminados. (Robinson J., 1975; Willet H., 1989).

El bacilo del tétanos tiene forma de un bastoncillo delgado, mide de 2 a 5µ de longitud y de 0.3 a 0.5µ de ancho, es Gram positivo, móvil, anoxigénico estricto, crece óptimamente entre 33 y 37°C, produce esporas que se localizan en un extremo dando a la bacteria un aspecto característico de tambor. Puede ser cultivado en medios enriquecidos especialmente suplementados con sustancias reductoras, a un pH neutro.

No es proteolítico y la actividad glucocidolítica depende específicamente de la cepa. (Mc Clung, L.S. *et al.*, 1971).

El *Clostridium tétani*, produce dos exotoxinas, la tetanolisina que no participa en la patogenicidad del tétanos y tetanospasmina, neurotoxina extremadamente tóxica, responsable de todos los síntomas de la enfermedad; es sintetizada como una única cadena polipéptica de peso molecular 150Kda, que se libera en el medio de cultivo una vez comienza la autólisis celular y por acción de proteasas bacteriales se divide en dos cadenas una liviana de 50Kda y una pesada de 100KDa. (Bizzini, Bernard. *et al.*, 1969)

Las personas enfermas presentan total recuperación al ser vacunadas con toxoide tetánico, sólo o combinado (presentación doble con toxoide diftérico, TD o Td; o triple incluyendo el componente contra la tosferina, DPT. (Finn, Junior 1984; Furste, Wesley *et al.*, 1974)

El toxoide tetánico producido en el laboratorio de tétanos del Instituto Nacional de Salud INS, es el filtrado de cultivos de *Clostridium tetani* en medio líquido Latham Mueller, detoxificado y purificado de forma tal que sin detrimento de su acción antigénica ha perdido su acción tóxica. (Bizzini, B. 1979; Bizzini, B. *et al.*, 1974.

Una vez obtenida la toxina se somete a cambios para eliminar su poder toxigénico, estos cambios se realizan mediante un proceso llamado Detoxificación, que consiste en agregar 0.4% v/v de formaldehído en solución al 37% y llevar a incubar en un período de 28 días a 37°C. Al final de este período se realizan pruebas biológicas de toxicidad, inoculando 1 mL de muestra por vía subcutánea en la zona lumbar del ratón. (Robinson, J. *et al.*, 1975; Rodríguez C., *et al.*, 1997; Shivao G., *et al.*, 1990; Franenkel, C., 1948).

El agente químico más utilizado para inactivar toxinas de células bacterianas y virus es el formaldehído. La introducción de este compuesto se le atribuye a Ramón en trabajos realizados en el Instituto Pasteur de París, sin embargo Glenny, del Laboratorio Fisiológico en Inglaterra propuso su uso desde 1904. (Ppuoli N., 1994). Se ha demostrado que el formaldehído es un excelente agente de entrecruzamiento formando enlaces metilénicos intra e intercadena. La formación de enlaces intermoleculares resulta en polimerización, lo cual explica la disminución en la actividad floculante específica. La acción del formol es inmediata 1 minuto después de su acción se observa una disminución notable en la toxina. La detoxificación se realiza en dos fases: en la primera fase que dura entre 7 y 24 horas se observa una alta disminución de la toxicidad. La toxicidad residual desaparece en la segunda fase en un proceso muy lento, después de 54 horas solamente prevalece rastros de actividad tóxica, pero la disminución total se logra hasta el 5 día. (Franenkel C., 1948; Gutiérrez I., 1995).

En este trabajo se evaluaron parámetros importantes en el proceso de detoxificación de la vacuna tetánica como son: tiempo y temperatura de incubación, lo cual aporta elementos adicionales en la optimización del proceso contribuyendo simultáneamente a la disminución de los costos de producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó el liofilizado de la cepa Massachussets de *Clostridium tétani*. La cual fue cultivada en medio Latham Mueller e incubada a 35°C por 7 días. La toxina obtenida fue centrifugada en vénulas estériles a 4000 r.p.m durante 30 minutos con el fin de eliminar los restos celulares, el sobrenadante fue colectado en garrafas de vidrio estériles.

Los ratones empleados para la prueba de toxicidad pertenecen a la cepa (NIH), los cobayos utilizados para la prueba de toxicidad espe-

cífica pertenecen a la cepa Hartley. Estos fueron suministrados por la División de Animales del Laboratorio del INS (Bioterio). Los reactivos químicos, fueron todos proporcionados por el Laboratorio de Tétanos del INS.

## DEFINICIÓN DE VARIABLES

Las variables a considerar fueron: días de observación del comportamiento de cada ensayo; temperatura de incubación de 4, 22 y 37°C; tiempo de incubación 0, 7, 14, 21, 28 días; concentración de proteína tetánica de 40 y 70 Lf/mL.

En la prueba de floculación de Ramón se manejó como única variable el tiempo de floculación en minutos. En la prueba de toxicidad, día de mortalidad, número de muertos y resultado final dado como satisfactorio según número ratones vivos sanos y como no satisfactorios los animales enfermos o muertos.

## MÉTODOS

1. *Determinación de la temperatura óptima de incubación:* Se utilizó un lote de toxina tetánica de 65 Lf/mL, el cual fue diluido hasta obtener una concentración de toxina de 40 Lf/mL; y para la concentración de 70 Lf/mL fue necesario concentrar la toxina utilizando filtración molecular (30.000 Nominal Molecular Weight Limit).

A la toxina se le adicionaron 20 mL de formaldehído al 0.5%, se distribuyó en frascos tapa rosca Schott estériles con capacidad de 500 mL, para iniciar el proceso de detoxificación, manteniendo como constantes el pH (7.0), la concentración de la toxina dada en Lf/mL y la concentración de formol mencionada anteriormente. Se realizaron 6 ensayos a una concentración de 40 Lf/mL y 70Lf/mL respectivamente; los cuales se incubaron con sus respectivos triplicados a diferen-

tes temperaturas 37, 4 y 22°C durante un período de 28 días. En el transcurso de la detoxificación se tomaron muestras a los 0, 7, 14, 21, 28 días de incubación para evaluar el título y la pérdida de toxicidad mediante pruebas de floculación de Ramón y toxicidad en Ratón. (Gutiérrez, I. 1998).

2. *Determinación del tiempo de incubación:* Conocida la temperatura óptima, se estudió el efecto del tiempo en la detoxificación de la toxina tetánica, conservando condiciones como pH 7.0, concentración de formaldehído 0.5% y concentración de proteína de 70 Lf/mL, se tomaron muestras los días 14, 18, 23 y 28 a fin de evaluar la pérdida de toxicidad, se probó el efecto tóxico mediante la toxicidad específica; inoculando 1 mL de la muestra por vía subcutánea en la zona lumbar de cobayos.
3. *Estimación del día exacto de detoxificación:* Para la estimación del tiempo de detoxificación se empleó un modelo logístico, técnica estadística apropiada para la representación matemática y la investigación entre dos variables; en particular la regresión logística de la probabilidad de que la variable dependiente caiga en uno u otro grupo. En este caso la variable dependiente es la detoxificación.
4. *Verificación de las características físico-químicas y biológicas del toxoide obtenido:* La toxina se sometió a un período de detoxificación de 25 días a 37°C. Al final de esta etapa, se purificó el toxoide mediante centrifugación, concentración, precipitación, diálisis, clarificación y esterilización. Para realizar las pruebas biológicas de control: toxicidad específica y antigenicidad.
5. *Métodos estadísticos:* La información se procesó en computador PC; mediante el programa estadístico Stat-Graphics para la

determinación del tiempo y temperatura de incubación. Se aplicó un análisis de varianza utilizando la teoría general de modelos bifactoriales de efectos fijos. Por medio del modelo matemático descrito mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{ijl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{kijl}$$

Donde:

i= 1,2,3,...,a. (número de niveles del primer factor Tiempo)

j= 1,2,3,...,b. (número de niveles del segundo factor Temperatura)

l=1,2,3,...,n. (número de réplicas por factor)

donde:

$\mu$ : Promedio general de la experimentación.

$\tau_i$ : Efecto sobre la respuesta que tiene el primer factor.

$\beta_j$ : Efecto sobre la respuesta que tiene el segundo factor.

$\varepsilon_{ijl}$ : Error experimental.

$Y_l$  Respuesta del experimento. El modelo matemático se aplicó para cuatro variables respuesta. Porcentaje de pérdida en título del toxoide, porcentaje de mortalidad de los animales sometidos a estudio, día óptimo de detoxificación, temperatura óptima de detoxificación.

*Modelo logístico para la estimación del día de detoxificación:* Se considero éste como una técnica estadística apropiada para la representación matemática y la investigación entre dos o más variables; en este caso la variable dependiente es la detoxificación.

$$P(x) = \frac{1}{1 + e^{-\beta + \beta_1 x}}$$

Donde  $\beta$  y  $\beta_1$  son parámetros desconocidos que se deberán estimar mediante mínimos cuadrados de manera iterativa. Utilizando el paquete estadístico SAS, para ajustar el modelo logístico.

## RESULTADOS

El porcentaje de pérdida no se ve influenciado al variar la cantidad de Lf/mL presentes en la toxina, es decir que se presentó una relación semejante en cuanto a pérdida de concentración, independiente de la temperatura y el tiempo de detoxificación; lo que significa que al trabajar con toxinas que difieran en concentraciones cercanas o iguales a 40 y/o 70Lf/mL, no representa mayor o menor porcentaje de remoción. (Ver Gráfica 1). En la temperatura de 37°C el porcentaje de remoción fue mayor (32%) pero se completó la detoxificación considerando ésta como óptima para el proceso, a diferencia de 22°C (30.4%) y 4°C (27%); que registraron porcentajes de remoción menores sin lograr la detoxificación (Ver Gráfica 2). De igual forma en 37°C se registró el menor porcentaje de mortalidad (44.4%), mientras que en 22°C (83.32) y 4°C (95.57), los porcentajes de mortalidad son muy altos (Ver Gráfica 3). Por tal razón se consideró 37°C como la mejor condición para el proceso.

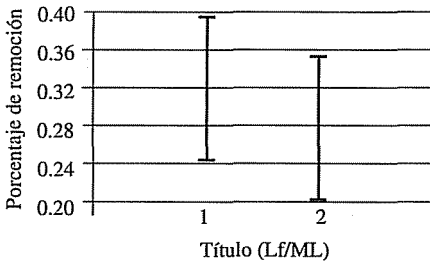
En la estimación del tiempo exacto de detoxificación se utilizó un modelo logístico aplicado, en el cual se encontró el día 25 como óptimo, mostrando una probabilidad de vida del 79.9%. Tabla 1, porcentaje que es cercano al límite aceptado (80%) (Ver Gráfica 4). Una vez conocidas las condiciones óptimas en la etapa de detoxificación, son decir, incubar la toxina durante 25 días a 37°C, se verificó la calidad del toxoide obtenido por medio de pruebas biológicas (toxicidad específica y antigenicidad), demostrando así que el producto cumple con las recomendaciones de la OMS.

**GRÁFICA 1.** Comparación de dos proteínas tetánicas vs. Porcentaje de remoción

BLOQUE 1 = 70Lf/mL BLOQUE 2 = 40 Lf/mL

Para Ho:  $U\ 70\ \text{lf/ml} = U\ 40\ \text{lf/ml}$   
 H1: Por lo menos un promedio es diferente.

El valor de p es de 0.56 la f calculada es de 0.33. Se rechaza la Ho



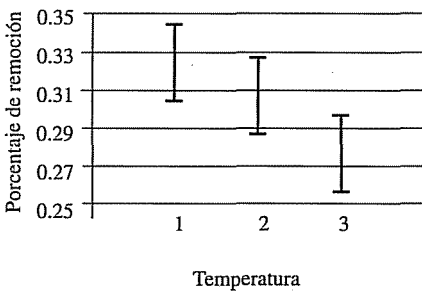
**GRÁFICA 2.** Comparación de porcentajes de remoción vs. Temperatura de detoxificación.

1 = 37°C 2 = 22°C 3 = 4°C

Para Ho:  $U\ 37\ C = U\ 22\ C = U\ 4\ C$

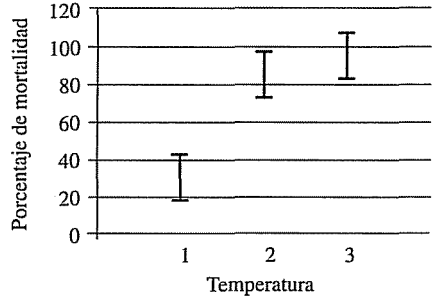
H1: Por lo menos un promedio de porcentaje de remoción es diferente, con relación a la temperatura.

El valor de p es de 0.0132 la f calculada es de 4.59. Se rechaza la Ho



**GRÁFICA 3.** Comparación del porcentaje de mortalidad vs. Temperatura de detoxificación.

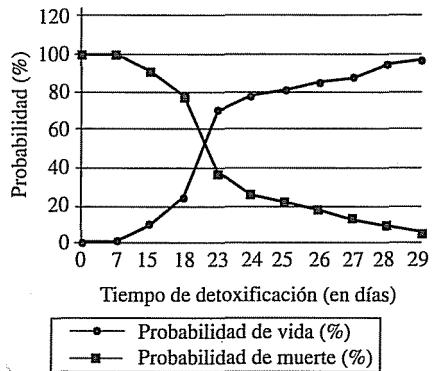
1 = 37°C 2 = 22°C 3 = 4°C



**TABLA 1.** Modelo logístico para la determinación del día exacto de detoxificación.

| Día de detoxificación | Probabilidad de muerte % | Probabilidad de vida % |
|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| 7                     | 99.2                     | 0.8                    |
| 15                    | 89.0                     | 11.0                   |
| 18                    | 74.1                     | 25.9                   |
| 23                    | 33.7                     | 66.3                   |
| 24                    | 26.4                     | 73.6                   |
| 25                    | 20.2                     | 79.9                   |
| 26                    | 15.2                     | 84.8                   |
| 27                    | 11.3                     | 88.7                   |
| 28                    | 8.2                      | 91.8                   |
| 29                    | 6.0                      | 94.0                   |

**GRÁFICA 4.** Modelo logístico para la determinación del día exacto de detoxificación.



## DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo que relacionaron el porcentaje de remoción con diferentes concentraciones de proteína tetánica a diferentes temperaturas y tiempos de incubación, no revelaron significancia al trabajar con concentraciones de proteína tetánica establecida. Estos resultados coinciden muy cercanamente a los estudios realizados por Rodríguez y Rojas en 1997; quienes evaluaron el porcentaje de remoción respecto a la disminución del pH y la concentración de formaldehído sin encontrar interacción respecto al porcentaje de remoción. En el presente estudio se ratificó que la concentración inicial de proteína frente al porcentaje de remoción de la misma no se ve afectado por factores como tiempo y temperatura de detoxificación. Tomando una proteína tetánica independiente de su concentración inicial se determinó la influencia de la temperatura sobre ésta; observando que el mayor promedio de remoción se encontró al trabajar con la temperatura 37°C; a diferencia de 22 y 4°C que mostraron menores promedios de remoción. Los resultados descritos anteriormente coinciden con los reportes elaborados por Amoureux, planteando que a bajas temperaturas no se disminuye considerablemente el valor floculante; debido a que la acción del formaldehído es lenta o tardía, de igual forma tampoco se consigue la detoxificación.

Para conocer el tiempo de detoxificación y según la literatura citada; algunos autores como: Bizzini, Turpin y Rainaud; aseguran que la detoxificación ocurre dentro de un período de 54 horas, y que la disminución total de la actividad tóxica se logra en el quinto día; Cheyroux expuso que al prolongar el tiempo de incubación por diez días más se consigue una detoxificación irreversible. Contrario a lo descrito por Mueller *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, posiblemente porque en sus ensayos emplea-

ron técnicas cromatográficas para obtener toxinas de alta pureza, que permitieron la rápida acción del formaldehído; además de otras variables como: pH, agitación constante del medio, volúmenes de toxina iguales a los empleados en producción y concentraciones diferentes de formaldehído.

Al evaluar estas apreciaciones no se tuvo en cuenta la pureza de la toxina, simplemente se eliminaron los restos celulares para dar inicio a la detoxificación, el pH siempre fue neutro, se cultivó estáticamente, los volúmenes evaluados no alcanzaron los 500mL y la concentración del formaldehído fue del 0.3% v/v; encontrando de esta manera mayor promedio de mortalidad en el día 0 y 14 que es donde menor cantidad de animales sometidos a estudio sobrevivieron, lo que significa que en un período de 7 días no se ha detoxificado la toxina; contrario a los resultados de los días 14 a 21 que mostraron un promedio de muertes semejantes; y en los días 21 y 28 se observó que todos los animales sobreviven, indicando que en este período ocurre el proceso de detoxificación.

Finalmente, con los métodos ensayados, se pudo establecer claramente que en el proceso de incubación para la detoxificación de la toxina tetánica se debe emplear una temperatura de 37°C durante 25 días. Obteniendo al año una ganancia de 1'513.350 dosis que representan en dinero un ahorro anual de \$37'833.750 en la producción de la vacuna tetánica, solamente al disminuir 3 días en el período de detoxificación. Las condiciones más apropiadas para el proceso de detoxificación de la vacuna tetánica se obtienen trabajando a 37°C durante 25 días de incubación, ya que las proteínas tetánicas incubadas a 37°C durante un período de 25 días logran la completa detoxificación con menor porcentaje de remoción de proteína inicial.

No es necesario utilizar para el proceso de detoxificación, proteínas tetánicas con Lf / mL determinados, ya que al trabajar con toxinas

que cuenten con concentraciones cercanas a 40 y/o 70 Lf / mL no se encontró mayor o menor porcentaje de remoción y no existe relación entre la disminución del valor floculante y la concentración de proteína tetánica inicial.

Las cosechas de toxinas tetánicas incubadas a temperaturas inferiores a 22 incluyendo 4°C, no presentan reacciones activas al contacto con el formaldehído, estableciendo estas temperaturas como no aptas para el proceso, aunque 22°C se puede considerar como temperatura óptima de trabajo ya que mostró un porcentaje intermedio (30.4%) frente a 4°C (27%) y 37 (32%) en la pérdida del valor floculante, pero para emplearla en procesos de detoxificación se hace necesario prolongar el tiempo de incubación.

Estadísticamente se requiere de un período de 25 días para completar el proceso de detoxificación de la toxina tetánica, independiente de su concentración inicial, y 25 días para el proceso de detoxificación representan un ahorro significativo en la producción del toxoide tetánico, ya que se optimizan las condiciones de fabricación y a su vez se disminuyen los costos de elaboración y se consigue aumentar el nivel de producción en número de dosis.

## LITERATURA CITADA

- BIZZINI B., TETANUS TOXIN. En: *Microbiology Reviews*, vol. 43, No. 2 (1979); p, 224-240. Tetanus. En: *Bacterial Vaccines*. (1984); págs. 37-67.
- BIZZINI BERNARD ET RAYNAUD MARCEL, *La detoxification des toxines protéiques par le formol: mécanismes supposes et nouveaux développements*. *Biochimie*, vol 56 (1974); págs. 297-303.
- BIZZINI B., TURPIN A. ET RAYNAUD M., *Producción y purificación de la toxina tetánica*, En: *Annales de l'Institut Pasteur*; vol 116, No 5 (1969); págs. 688-712.
- CHEYROUX M., *TOXINE TETANIQUE EL FORMOL*. En: *Annales de l' institut Pasteur*, vol 86 (1954); págs. 356-369.
- FRANKENEL C. and OLCOTT H., *Reacción of formaldehyde with proteins. Cross-linking of amino group with phenol,imidazole, or indole groups*. En: *Journal of Bacteriology*, vol 48 (1948); págs. 827-843.
- FINN J., ET AL *The structural gene for tetanus neurotoxin in on a plasmid*. En: *Science*, vol 224 (may 1984); págs. 881-884.
- FURSTE W. y VARONESI R., *Tétanos*. Bogotá: Lerner, 1974.
- GUTIÉRREZ I., *Manual de Producción del toxoide Tetánico a Granel*. Santafé de Bogotá, 1995.
- MC CLUNG L.S., ET AL *Studies on Anaerobic Bacteria: I.A corn-liver Medium for the detection and dilution counts of various Anaerobes*. En: *Journal of Bacteriology*, vol 67 (1971); págs. 47-56.
- MUELLER H. and MILLER P., *Factors influencing the production of the tetanal Toxin*. En: *Journal of Immunology*, vol 56(1948); págs. 143-147.
- PPUOLI R., *Toxin inactivation and antigen stabilization: two different uses of formaldehyde*. En: *Vaccine*, vol 12. No.7(1994); págs. 579-81.
- ROBINSON J., PICKLESIMER J. and PUETT D., *Tétanos toxin: The effect of chemical modifications on toxicity, immunogenicity, and conformation*. En: *Journal of Biological chemistry*, vol 250, N° 18 (sep.1975); págs. 7435-7442.
- RODRÍGUEZ C., ROJAS J., *Evaluación de la influencia del pH y concentración de*



*formaldehído en la disminución del valor flocculante de la Toxina Tetánica en el proceso de Detoxificación.* Santa Fe de Bogotá, 1997.

SHIVAO G., *et al.* *An inact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of Tetanus Toxine.* En: *Infection and*

*immunity*, vol 58, N°12 (dec 1990); págs. 4136-4141.

WILLET H.P; WOLFGANG J. AND BERNARD A., *Zinsser microbiología.* 18 edición, 1989. Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina.