Sueros antirrábicos de alto título

II Parte

Fraccionamiento para la purificación y concentración

ESTUDIOS QUIMICOS Y ELECTROFORETICOS

POR LOS

Dres. JORGE F. FRATTINI [1] y CARLOS A. MAZZINI [2]

La terapéutica por suero de animal hiperinmune para el tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan al hombre, ha dado hasta la fecha verdaderos y felices resultados. Sin embargo, presenta dos inconvenientes, por suerte salvables, en su preparación.

El primero, sería el tenor y la fijeza de los elementos esenciales para brindar una eficiente inmunidad pasiva.

El segundo, la reacción sensibilizante producida en el organismo en que se inyecta.

Por esta causa se han ideado numerosas técnicas para enriquecer de sustancias inmunes o anticuerpos específicos al suero sanguíneo del animal en experimentación, aquellas corresponden a procedimientos biológicos, bacteriológicos y puramente físico-químicos.

Dentro de estos últimos nos ocuparemos, mencionándolos sucintamente, de dos métodos de fraccionamiento de las distintas parcelas o entidades seroproteicas por precipitación, que hemos utilizado durante nuestra experimentación con suero antirrábico de procedencia equina.

1º) Por alcohol metílico, según la modificación debida a Dubert y colaboradores (4) del método de Pillemer y Hutchinson (10).

Este procedimiento requiere trabajar a temperaturas menores de O° C., para lo cual hubo que enfriar no sólo las sustancias reaccionantes,

[1] Mayor Bioquímico, Jefe de la Sección Laboratorios. Div. Hig. y Med. Prev. (D.G.S.).

[2] Profesor Adjunto de la Cátedra Sueros y Vacunas.

sino también los aparatos, siendo por lo tanto dificultoso y a la vez engorroso, si no se dispone de medios especiales.

Si bien los estudios químicos nos arrojan los valores cuantitativos buscados, las pruebas electroforéticas sobre papel no tuvieron el mismo éxito en cuanto a la calidad de los diagramas obtenidos en esta etapa. (Gráfico C. Nº 2).

Comparativamente a estos trabajos, se efectuaron las pruebas biológicas con el producto obtenido en medio alcohólico que se detallaron en la comunicación anterior (11), en la que se demuestra una pérdida sensible del poder protector con relación al que dió el suero antirrábico en bruto (S.A.R.), de acuerdo con los resultados que arrojaron las pruebas de neutralización sobre lauchas.

Teniendo en cuenta estos resultados, agregados a una situación que se nos presentó con el producto tratado por metanol en medio amortiguado a una concentración final del 30 %, cuya solución conservada en heladera a una temperatura entre 4 a 8° C. presentó una marcada precipitación de sustancia proteica, irreversible, lo que nos indujo a probar otro procedimiento de separación proteica con el fin de fraccionar y concentrar las sustancias nobles del SAR.

2º) Por sulfato de sodio anhidro, según la modificación propia (6-7) del método de Howe (9), con el mismo fin de excluir algunas de las sustancias sin mayor valor terapéutico y de concentrar las útiles para tal propósito. Por este procedimiento obtuvimos mayor éxito que con la técnica anterior, además se trabaja a temperatura del laboratorio evitando los inconvenientes de enfriar los elementos, sin modificar el pH de los líquidos reaccionantes que se encuentran cerca de la neutralidad (pH:6, 5 - 7, 5), y por tener gran experiencia con él sobre sueros sanguíneos humanos para diferenciar y valorar el espectro proteico y sus constituyentes: *Albúminas,* y las distintas *fracciones globulínicas* denominadas: *alfa* α , *beta* β y *gamma* γ , de acuerdo con la nomenclatura de Tiselius (12-13-14) que las estudió electroforéticamente.

Al suero antirrábico completo (SAR), lo tratamos asépticamente por sulfato sódico anhidro a concentraciones finales de 27 % y 16,7 % con relación al volumen del solvente, manteniéndolos en frascos herméticamente cerrados y protegidos de toda contaminación a una temperatura de 37° C, durante 20 - 22 horas.

En esta etapa la concentración del sulfato sódico deshidrata las micelas coloidales en seudosolución y las hace precipitar del medio líquido sin mayor desnaturalización. Las más sensibles a este efecto son las macromoléculas globulínicas, siendo en orden decreciente: gammas,

betas y alfas; por último precipitan las albúminas, las más resistentes a este efecto, a concentraciones salinas que intencionalmente no alcanzamos.

Con este procedimiento el fraccionamiento fue más completo que con el anterior, ya que con la sal al 27 % precipitan la totalidad de las globulinas, dejando en el soluto únicamente las albúminas.

En el caso de la sal a 16,7 % precipita únicamente la fracción gamma (GG), quedando en el soluto junto a las albúminas las globulinas alfa y beta, las que antiguamente se llamaron por esto "seudoglobulinas".

Los precipitados se separaron de sus correspondientes solutos por filtración al vacío a través de papel Whatman Nº 40 en un filtro de Buchner. Los líquidos albuminosos los guardamos para ulteriores pruebas químicas y electroforéticas. (Ver cuadro Nº 1, gráficos A, del 2 al 7 y gráfico C, Nº 2).

Los respectivos precipitados se disolvieron con solución salina isotónica estéril, tratando en este caso de solubilizarlos en el menor volumen a objeto de su concentración. Esto no fue posible con el precipitado de globulinas totales (GT), ya que lo tuvimos que llevar a igual volumen del suero (SAR) inicial (Dilución: 1/1). Por el contrario, con el precipitado al 16,7 % (GG), pudimos disolverlo en la mitad de su volumen original, concentrándolo por lo tanto al doble (Dilución: 2/1).

Las soluciones se esterilizaron por pasaje a través de filtro "Seitz" por aspiración en medio estéril.

Nuestro proceder se fundó en el principio de separar y eliminar toda sustancia innocua para el acto inmunitario buscado y que a la vez pueda incidir en probables fenómenos de hipersensibilidad o alérgicos no buscados en el organismo inoculado. Conociendo por un lado, la inutilidad para tal fin terapéutico de la fracción *albúmina,* Tiselius y Kabat (15) y Doerr (3), y por el otro, que dentro de las globulinas, la fracción *gamma* encierra la totalidad o por lo menos la gran mayoría de los anticuerpos específicos e inespecíficos circulantes, mientras que la fracción *beta* no tiene mucha importancia y menos la fracción *alfa.*

También se habla de un componente T, que migra electroforéticamente entre las fracciones *gamma* y *beta,* confundiéndose en muchas oportunidades con la primera, se nota especialmente en sueros antitóxicos, Van der Scheer y colaboradores (16). Nosotros lo mencionamos sin abrir juicio sobre este componente —aun cuando en los electroforogramas obtenidos del SAR, se nota una gruesa zona difusa entre las fracciones *beta* y *gamma,* que también se acusan en las curvas densito-

métricas de aquellos— por no tener experiencia sobre el particular y además por no trabajar en este caso, con bacterias ni con toxinas, sino con virus rábico la seguiremos considerando como fracción *gamma*.

Paralelamente a la separación, purificación y concentración de las distintas fracciones proteicas del SAR, realizamos también los estudios químico cuali-cuantitativos por medio de la reacción del biuret y electroforético sobre papel, según Durrum (5), no sólo de ellas sino también del SAR original y de sueros de equinos jóvenes, sanos y sin ninguna clase de inmunización artificial (SNC), para verificar comparativamente los distintos electroforogramas y sus correspondientes curvas densitométricas que nos muestran de una manera nítida las variaciones del espectro proteico durante el proceso inmunogénico; como los resultantes productos del fraccionamiento salino (ver gráficos. Series A), para luego compulsar los mismos con los resultados de las pruebas biológicas efectuadas a la vez con SAR, concentrado alcohólico y GT y GG obtenidas por vía salina.

Con esto, imitamos dentro de nuestras posibilidades, los trabajos de COHN y colaboradores (1-2) sobre sueros humanos fraccionados por precipitación con sulfato de amonio y estudiando las distintas parcelas por electroforesis libre.

Nuestros estudios electroforéticos sobre papel y su posterior densitometría los realizamos con aparatos "Hidrogenión" de procedencia nacional, utilizando una modificación del amortiguador de Durrum, pH 8,6, con veronal-veronal sódico agregándole acetato sódico para una mejor estabilización, pero bajando su fuerza iónica $> = 0{,}06$), para aprovechar una corrida de sólo 5 horas a 200 v - 12 mA; lo que nos dió excelentes resultados.

Las tiras de papel fueron teñidas con azul de bromofenol en medio alcohólico saturado con bicloruro de mercurio. De cada una de ellas se obtuvo el correspondiente perfil o curva por densitometría a célula fotoeléctrica. La medición relativa de las respectivas áreas que señalan las distintas fracciones componentes de un suero se llevó a cabo con un planímetro por compensación "Coradi". Con estas cifras se calcularon los valores absolutos convirtiendo matemáticamente las relaciones porcentuales de cada fracción de acuerdo con la cifra en gramos de proteínas totales, obtenida del suero en estudio por método químico colorimétrico (8). En el cuadro Nº 1, se detallan los valores absolutos y relativos de los análisis químicos y electroforéticos realizados durante esta experimentación.

Si estudiamos comparativamente los distintos gráficos densitométricos del SNC y del SAR, comprobamos la gran diferencia entre las

CUADRO N.º 1

VALORES PROMEDIOS ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LOS ANALISIS QUIMICOS, ELECTROFORETICOS Y BIOLOGICOS

	QUIMICO			ELECTROFORESIS (PAPEL)								BIOLOGICO
	Proteínas totales	Globulina gamma		Albúmina		Globulinas						Prueba de suero neutralización
						ALFA		BETA		GAMMA		
	g. X 100 cc.	g.	%	g. X 100 cc.	%	g.	%	g.	%	g.	%	Ind. Prot.
Suero normal caballo (SNC)	6.62	1.25	18.88	2.97	44.86	1.28	19.33	1.10	16.62	1.27	19.19	
Suero antirrábico (SAR)	7.69	2.74	35.63	2.42	31.47	1.43	18.60	1.24	16.63	2.60	33.81	200.000
SAR concentrado x metanol (4/1) ...	14.00	8.37	59.78	—	—	—	—	—	—	—	—	73.000
SAR purf. (G.T.) separ. salina (1/1) .	4.74	2.94	62.02	0.00	00.00	1.26	26.58	0.97	20.47	2.51	52.95	109.000
SAR residuo soluble al 27 %	2.53	0.00	00.00	2.15	84.98	0.20	7.99	0.18	7.12	0.00	00.00	
SAR purf. (G.G.) conc. separ. sal. (2/1)	6.04	5.16	85.43	0.00	00.00	0.00	00.00	1.02	16.89	5.02	83.11	186.000
SAR residuo soluble del 16.7 %	4.29	0.00	00.00	2.34	54.54	1.05	24.48	0.90	20.98	0.00	00.00	

superficies globulínicas de ambos y en especial de la fracción *gamma*, que es la menos movilizable.

Dejando de lado las cifras absolutas, por corresponder a individuos distintos y por no poderse correlacionar, y estudiamos únicamente las cifras relativas (cuadro Nº 1), que verdaderamente guardan indudable valor proporcional entre las diversas variedades proteicas del suero sanguíneo de cada especie animal, diferenciándose por sus variaciones distintos estados o procesos patológicos que inciden sobre el equilibrio biodinámico serocoloidal; comprobamos en nuestro caso una alteración del metabolismo proteico del animal hiperinmunizado y la importancia de la electrofresis al visualizar esta desviación intensa hacia la zona menos desplazable del campo eléctrico como resultado del proceso inmunogénico.

En el cuadro Nº 2, se cotejan las cifras relativas entre ambos sueros (cifras promedios de 3 determinaciones individuales de cada serie).

CUADRO N.º 2

Fracción proteica	Comparación de las cifras proporcionales obtenidas por electroforesis sobre papel, entre suero normal de caballo (SNC) y suero antirrábico en estudio (SAR)		
	SNC	SAR	Diferencia en favor de SAR
Albúminas	44,86 %	31,47 %	— 13,39 %
Alfa, globulina	19,33 „	18,60 „	— 0,73 „
Beta, globulina	16,62 „	16,12 „	— 0,50 „
Gamma, globulina	19,19 „	33,81 „	+ 14,62 „
	100,00 %	100,00 %	00,00 %

La proporción relativa de *albúminas* disminuye significativamente de SNC a SAR, y lo interesante resulta que casi esa misma tasa se encuentra por completo en el aumento de la fracción *gamma*, que encierra según los conocimientos actuales todas o la gran mayoría de las sustancias anticuerpos específicos o inespecíficos circulantes existentes en el suero sanguíneo de los mamíferos. Las restantes fracciones —globulinas alfa y beta— prácticamente no se modifican, pues no llegan a alcanzar sus variaciones el 1 % del monto proteico total.

Por otra parte, se utilizó la electroforesis para seguir las distintas etapas del fraccionamiento por salazón, tanto de la parte precipitada como de la de los residuos salinos solubles al 27 % y 16,7 %.

De estos últimos se separó gran parte del sulfato de sodio por cristalización en frío (permanencia durante 48 - 72 horas en refrigerador a O° C., cerca del congelador). Ver gráficos Serie A, Nros. 4 al 7.

Conocíamos de antemano, que la manipulación del suero sanguíneo con metanol o con sales neutras en concentración masiva traía aparejada cierta desnaturalización de sus frágiles biocoloides proteicos, a pesar de haberlo hecho en la mínima extensión posible, sin usar álcalis y ácidos que hicieran variar en demasía al pH del medio, como tampoco utilizar otros factores de temperatura como ser: excesivo calor, nunca se pasó de 37° C., ni intenso frío, sólo alcanzamos en este extremo el límite de - 5° C., comprobamos por los resultados obtenidos por vía biológica, por medio de la prueba de seroneutralización a la laucha, acusan en todos estos preparados una disminución de su poder protector con respecto al SAR, de origen no purificado. Sólo podemos decir —según los resultados de dicha prueba— que la GG, a pesar de perder aproximadamente un 50 % de su valor protector, por estar concentrada dos veces (2/1), mantiene a igualdad de volumen, la misma potencia que al SAR original.

Sumario

1. — Se estudia el suero antirrábico (SAR) de procedencia equina, por vías químicas y electroforética sobre papel para valorar sus distintas fracciones proteicas y se comparan con sueros sanguíneos de animales sanos y sin ninguna vacunación (SNC).

2. — Para separar las globulinas del suero inmune (SAR), se usaron técnicas de precipitación en medio alcohólico refrigerado y en medio salino a temperatura ambiente en dos concentraciones de sulfato sódico al 27 % y 16,7 %, que separan respectivamente globulinas totales (GT) y globulinas gamma (GG). Fueron verificadas por los correspondientes estudios químicos y electroforéticos.

3. — Estos fraccionamientos se efectuaron con los fines de eliminar sustancias innocuas al acto inmunitario, es decir, purificar el suero terapéutico y a la vez concentrar las fracciones útiles, como se ha hecho con la fracción globulínica "gamma", tratando de reducir a un mínimo despreciable los factores sensibilizantes inespecíficos sobre el organismo inoculado.

4. — Comparativamente a estas investigaciones físico-químicas se efectuaron pruebas biológicas de neutralización sobre laucha, las que arrojaron resultados no concordantes con los fines perseguidos en esta experimentación en cuanto a la potencia defensiva de los distintos pre-

parados, salvo el concentrado de GG. que a igualdad de volúmenes inyectados posee el mismo poder del SAR, original.

Summary

Anti-Rabics serum of high titer. II.
Divisions into fractions for the purification and concentration.
Chemical and electrophoretical studies.

1º — The equine antirabies serum (SAR) is studied by chemical and paper electrophoretic techniques. Their different protective fractions are measured and compared with those of normal serum (SNC).

2º — Frozen alcohol media and natrium sulfate at 27 and 16,7 % were used to precipitate the serum globulins. Whole globulins and gamma globulins. These were studied by chemical and electrophoretic means.

3º — These fractions were made in order to eliminate innocuous substances to inmunizations, that is to purity the therapeutic serum concentrating the useful fractions of the gamma globulin and trying to reduce the sensitizations factors.

4º — These physical and chemical researchs, performed comparatively with biological tests of neutralization in white mice, did not agree with the defensive power of each fraction except the concentrate of gamma globulin which has a equality of volume the same power of the original antirabies serum.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohn, E. J., (1945). Science. 101: 51.
2. Cohn, E. J., (1944), Oncley, J. L.; Strong, L. E.; Hughes, W. L. y Armstrong, S. H. J. Clin Invest. 23/4: 417.
3. Doerr, R. (1952). "Los anticuerpos". 1ª parte. Bibliot. Ibis, Madrid.
4. Dubert, J. M.; Slizewicz, P.; Rereyrotte, P. y Macheboeuf, M. (1953). Ann. I. Pasteur. 84/2: 370.
5. Durrum, E. L. (1950). J. Amer. Chem. Soc. 72: 2943.
6. Frattini, J. F. (1951). Rev. Asoc. Bioq. Argent. XV: 372.
7. Frattini, J. F. (1956). Rev. San. Milit. Argent. LV/1: 83.
8. Frattini, J. F. (1950). Rev. San. Milit. Argent.XLIX/2: 146.
9. Howe, P. E. (1921). J. Biol. Chem. 49: 93.
10. Pillemer, L. y Hutchinson. M. C. (1945). J. Biol. Chem. 159: 299.
11. Schang, P. J.; Mazzini, C. A.; Crescini, A. G. de y Crescini, A. C. Preparación, titulación, aplicación experimental y en medicina humana de sueros antirrábicos de alto título. Comunicación en la Asociación Argentina de Microbiología el 8 de noviembre de 1957.
12. Tiselius, A. 1937). Biochem. J. 31/I: 313.
13. Tiselius, A. (1937). Biochem. J. 31/I: 1464.
14. Tiselius, A. (1937). Transact. Faraday Soc. 33: 524.
15. Tiselius, A. y Kabat, E. A. (1939). J. Exp. Medic. 69: 119.
16. Van der Scheer, J.; Wyckoff, R. W. G. y Clarke, F. R. (1940). J. Inmunol. 39: 65.

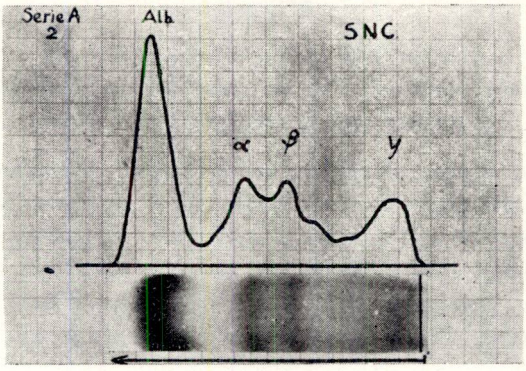

Gráfico A. Nº 2

Electroforograma y curva densitométrica, tipos de suero de caballo joven normal, sano y virgen de inoculaciones antigénicas.

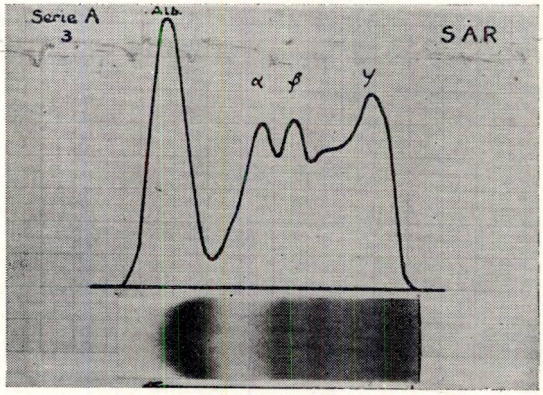

Gráfico A. Nº 3

Electroforograma y curva densitométrica, tipos del suero antirrábico. Significativo aumento de la zona correspondiente en especial a las fracciones gamma y beta.

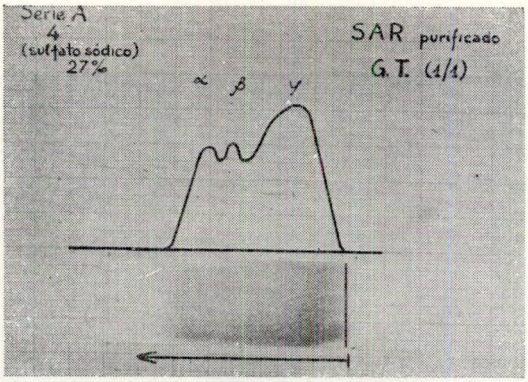

Gráfico A. Nº 4

Electroforograma y curva densitométrica correspondientes a la migración eléctrica de la disolución del precipitado total (G.T.) obtenido con solución de sulfato sódico al 27 %.

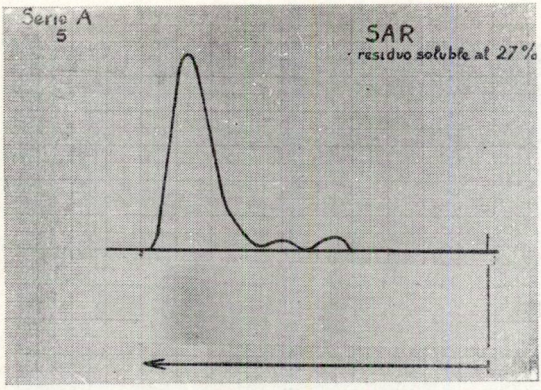

Gráfico A. Nº 5

Electroforograma y curva densitométrica correspondientes a la migración eléctrica del residuo soluble obtenido luego del precipitar globulinas con solución de sulfato sódico al 27 %. Se observa un pequeño residuo globulínico adherido a la albúmina.

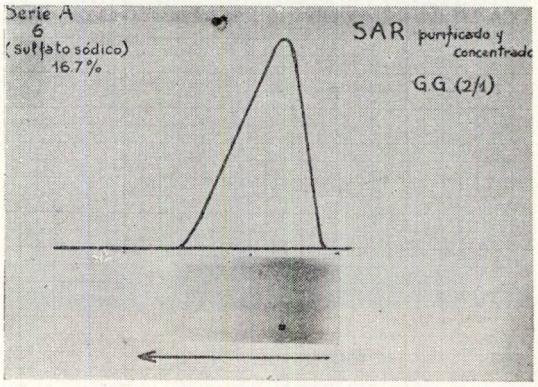

Gráfico A. Nº 6

Electroforograma y curva densitométrica correspondientes a la migración eléctrica de la disolución del precipitado de globulina gamma (G.G.) obtenido con solución de sulfato sódico al 16,7 %.

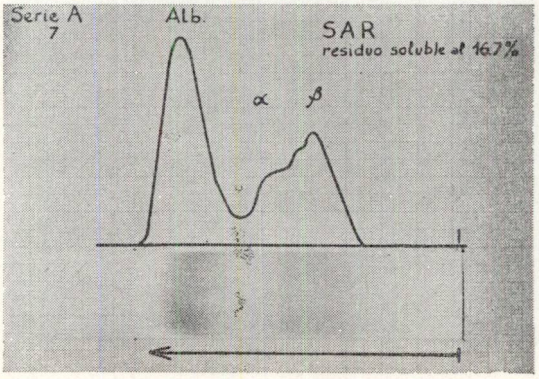

Gráfico A. Nº 7

Electroforograma y curva densitométrica correspondientes a la migración eléctrica del residuo soluble obtenido luego de precipitar globulina gamma con solución de sulfato sódico al 16,7 %.

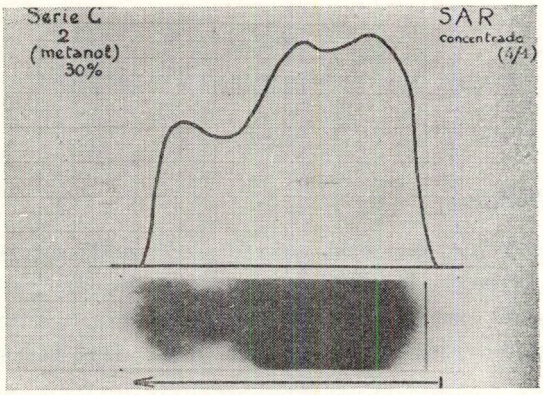

Gráfico C. Nº 2

Electroforograma y curva densitométrica correspondientes a la migración eléctrica de la disolución del precipitado obtenido por tratamiento con metanol al 30 % en frío.