

Dimensionamiento de los sistemas de microfiltración y ultrafiltración para la producción de la Toxina Tetánica elaborada en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Microfiltration and ultrafiltration systems dimension for using in Tetanus Toxin production in the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

JOSÉ G SANTIAGO D¹, MERY FARÍA¹ Y GABRIEL OLMO²

RESUMEN

Se evaluó el uso de la tecnología de Flujo de Filtración Tangencial (FFT), para obtener la toxina tetánica a partir de cultivos de la bacteria *Clostridium tetani*, usando el proceso de Microfiltración (MF), para eliminar el paquete celular y posteriormente, a partir del filtrado obtenido, concentrar y diafiltrar la Toxina Tetánica usando el proceso de Ultrafiltración (UF). Se determinaron las características de los filtros, condiciones de trabajo y el dimensionamiento de los equipos a adquirir para la nueva producción industrial de Toxina Tetánica. Se evaluaron el flujo, tiempo, rendimiento del proceso y las características del producto obtenido. Utilizando cultivos con Toxina Tetánica en un equipo de filtración de laboratorio, diseñado para producir el efecto de FFT. Se seleccionó las membranas tipo cassettes, formato Suspended Screen, porosidad 0,2µm, como las adecuadas para el proceso de MF, ya que mostraron un 100% de transmisión de la Toxina Tetánica, ausencia de restos celulares y flujo promedio de filtrado de 73.30 L/m²h. Así mismo, se seleccionaron las membranas tipo cassettes, formato Omega, porosidad 50 y 70 kDa, como las adecuadas para el proceso de UF, ya que mostraron 100% de recuperación de la toxina, ausencia de toxina en el filtrado y adecuados flujos de filtrado (106,7 y 104,4 L/m²h, respectivamente). Estos resultados permitieron dimensionar, considerando las variables a utilizar en la producción industrial (Volumen 650 a 950 litros, tiempo de procesos, 3 horas), el área de filtración de los equipos de MF y UF a adquirir, estimados en 20m² y 5m², respectivamente.

Palabras clave: Toxina tetánica, separación celular, microfiltración, concentración de proteínas, ultrafiltración.

ABSTRACT

Tangential Flow Filtration (TFF) technology was evaluated to process tetanus toxin which is produced by *Clostridium tetani* bacterium. Microfiltration (MF) is used to retain cells while allowing passage of the toxin to the filtrate stream. The filtrate is collected and further processed by Ultrafiltration (UF) to concentrate the toxin and to maximize the wash of small species by a Diafiltration step. Both, MF and UF processes were evaluated to specify the filters and corresponding critical process parameters to scale-up the application. As part of the evaluation, flow rate, processing time, yield and product attributes were characterized. The cell harvest containing the tetanus toxin was processed using a laboratory scale TFF system designed to product the TFF effect. The evaluation demonstrated that a cassette in suspended screen format and membrane with 0.2µm pore is the right selection for the MF step. It showed 100% of toxin transmission without the presence of cellular debris and average process flux of 73.30 L/m²h. The UF step was conducted using the same system with cassettes in medium screen format with pores of 50 and 70kDa. It showed 100% retention of the toxin with a process flux of 106,7 and 104,4L/m²h, respectively. To maximise product retention during UF, the 50 kDa membrane was selected. These results were used to scale-up the application to process the industrial volume of 650 a 950 liters in 3 hours of processing time. Membrane area sizing of MF and UF to be acquired is estimated in 20m² and 5m², respectively.

Key words: Tetanus toxin, cell separation, microfiltration, protein concentration, ultrafiltration.

¹ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", División de Producción de Vacunas Bacterianas

² Pall Corporation, Puerto Rico

INTRODUCCIÓN

La toxina tetánica es una proteína de peso molecular de 150.000 Daltons, la cual es producida por la bacteria *Clostridium tetani*, causante del tétano. Su actividad biológica puede ser inhibida agregando formaldehído al cultivo sin destruir la estructura de la proteína y así obtener el toxoide tetánico (1), a través de una reacción inicial, completamente reversible, con las moléculas de las proteínas presentes en la solución, mediante un ataque nucleofílico a los grupos ϵ -amino de la lisina (2). El toxoide tetánico, una vez purificado, es utilizado como antígeno para la formulación de la Vacuna Combinada DPT (toxoi-de diftérico, vacuna pertussis y toxoide tetánico), producida en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) (3).

Con el fin de incrementar la capacidad de producción, actualizar la tecnología e incursionar en nuevos mercados, el INHRR está construyendo una nueva planta para la producción de vacunas simples y combinadas inactivadas en base a la vacuna DPT, con una capacidad de producción estimada en 45.000.000 de dosis anuales de toxoide tetánico. Esto implica un aumento significativo en la producción, un cambio de tecnología y por ende una selección de los equipos a utilizar para la separación celular y concentración de la proteína, a objeto de dimensionar el equipamiento adecuado cónsono con los criterios de calidad internacionales que rigen la producción de Biológicos.

Para la obtención de la toxina tetánica, es necesario realizar dos procesos consecutivos posteriores al proceso de producción en fermentadores: el primer proceso consiste en la eliminación de los restos de bacterias producto de la lisis celular en el cultivo a través de un proceso denominado MF y en el segundo proceso, consiste en la eliminación de proteínas de bajo peso molecular y concentración de la toxina tetánica, a través de un proceso denominado UF (4).

En este sentido, se realizaron pruebas piloto utilizando diferentes formatos de membranas elaboradas con Polietersulfona (PES), con el fin de determinar el flujo y tiempo de proceso, rendimiento y características del producto obtenido y de esta manera dimensionar el área de filtración de los equipos para la realización de los procesos de MF y UF de la toxina tetánica, a ser adquiridos para la Nueva Planta de Producción de Vacunas del INHRR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toxina Tetánica:

Se utilizó la cepa liofilizada Harvard Boston Caracas de la bacteria *Clostridium tetani*, para la producción de la toxina tetánica siguiendo los procedimientos descritos por Luciani (4). Se utilizaron los sub-lotes FC-E-01/07 y FC-E-02/07 para las pruebas de MF y el filtrado obtenido, se utilizó para las pruebas de UF.

Concentración de la toxina

La concentración de toxina tetánica se determinó utilizando la técnica de Floculación (5), la cual se expresa en Lf (Limite floculante) por ml, (Lf/ml), donde el valor de Lf se define como la cantidad de toxina que al combinarse con una unidad de Antitoxina produce una mezcla de proporciones óptimas para la floculación o formación de un complejo antígeno-anticuerpo, el cual precipita y puede verse a simple vista o magnificándolo a través de una lupa convencional.

Transmisión de células al filtrado

La presencia de células en los procesos de filtración fue evaluada observando las muestras en un microscopio óptico a 100X. Es importante señalar, que esta prueba no fue realizada para determinar pureza del cultivo sino transmisión de células a través de las membranas.

Presencia de la toxina

La presencia de la toxina obtenida a partir del filtrado recuperado durante el proceso de UF se determinó realizando Electroforesis en Geles de SDS-PAGE en fase de gradiente de gel 8-25 y tinción de plata (6). Se colocaron 50ug/ul de proteína por bolsillo. Como control se utilizó una muestra del lote 143 Toxoide Tetánico Purificado (TTP-143).

Pureza de la toxina

La pureza de la toxina obtenida del proceso de UF se determinó según la Técnica de Kjeldahl (7) para la determinación de Nitrógeno Proteico Total. Como control se utilizó una muestra del TTP-143.

Pruebas de MF y UF

Las pruebas de MF y UF se realizaron en un equipo de laboratorio Centramate, suministrado por la empresa

Pall Corporation, compatible con todos los formatos de membranas de las principales firmas comerciales del mercado, el cual es diseñado y construido para producir el efecto de FFT en membranas, formato tipo cassettes, con un área de filtración de 0.1 m² por cassette. Se seleccionaron membranas nuevas de diferentes formatos y porosidades de la firma Pall, en virtud que no se tiene experiencia en Latinoamérica en el uso de estas membranas para la producción de toxina diftérica, siguiendo las condiciones de trabajo que se especifican en la tabla 1. Para realizar cada prueba de MF se utilizaron 6 litros del cultivo obtenido directamente del proceso de producción de la toxina tetánica a una concentración de 90 Lf/ml, y a partir del sobrenadante obtenido en ésta prueba, se tomaron 4 litros para la realización de las pruebas de UF a una concentración de toxina tetánica de 90 Lf/ml.

Para la realización de las pruebas de MF y UF, se ensambló un sistema como se observa en la figura 1. Se colocó el producto a filtrar en el envase correspondiente y por medio de una bomba peristáltica, se hizo pasar dicho producto a través de la unidad de filtración, donde se instalaron los diferentes formatos de los filtros a probar. Por la línea de Producto Filtrado, debe pasar el producto que ha atravesado el filtro (transmisión) y por la línea de Producto Retenido debe retornar al envase inicial, el producto que no pudo ser filtrado. La presión de entrada (PE) se estableció con el manómetro instalado en la Línea de Alimentación, entre la bomba y el módulo del filtro. La Presión de Retorno (PR) se estableció con el manómetro instalado en la línea de producto retenido, entre el filtro y la válvula de retorno. La diferencia de presión (DP) es la resta entre PE y PR. La Presión de Filtrado (PF) se estableció con el manómetro instalado en la Línea de Producto Filtrado, entre el filtro y la válvula de fil-

trado. La Presión Transmembrana (PTM) se estimó como el resultado obtenido al promediar los valores de las PE y PR y restarlo al valor obtenido en el manómetro ubicada en la Línea de Filtrado. El flujo del filtrado se determinó dividiendo el valor obtenido en el flujómetro instalado en la Línea de Producto Filtrado, entre el área de filtración del cassette. El Flujo Promedio de Filtrado se calculó promediando los valores del flujo del filtrado obtenidos durante el proceso de filtración.

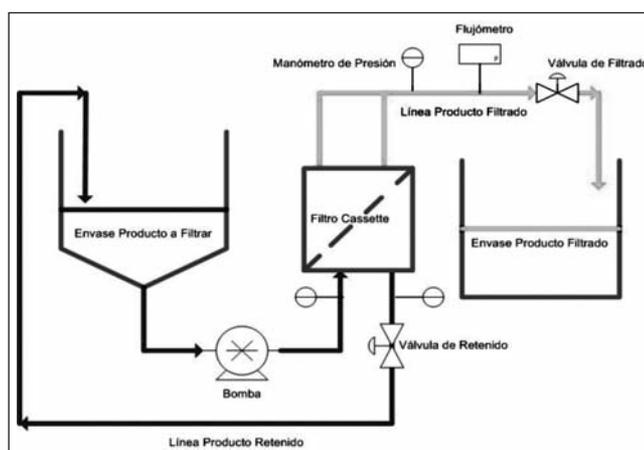


Figura 1. Diagrama esquemático del diseño para la realización de las pruebas de MF y UF.

Las pruebas a realizar consistieron en determinar el efecto del tiempo y de la PTM sobre el flujo de proceso, para lo cual se recirculó todo el sistema, colocándose las Líneas de Retorno de Productos y de Filtrado de Producto en el Envase de Producto a Filtrar, estableciéndose las condiciones según lo indica cada ensayo. Posteriormente y con el valor de la PTM establecido, se realizó el efecto de la concentración del Producto a Filtrar sobre el flujo de

Tabla 1

Características de las membranas y condiciones de trabajo establecidas en las pruebas de MF y UF.

Producto a filtrar	Proceso	Formatos y porosidades evaluadas	PE (Bar)	PR (Bar)	DP (Bar)	PF (Bar)	PTM (Bar)
Cultivo de <i>Clostridium tetani</i>	MF	<ul style="list-style-type: none"> - Medium Screen (MS) Supor 0,2 µm - Médium Screen (MS) Supor 0,65 µm - Médium Screen Omega 1000 kDa - Suspended Screen (SS) Supor 0,2 µm 	2	1,5	0,5	0	1.75
Filtrado obtenido del proceso de MF	UF	<ul style="list-style-type: none"> - Medium Screen (MS) Omega 50 kDa - Medium Screen (MS) Omega 70 kDa 	1.5	1	0,5	0	1,25

proceso, lo que constituye el proceso de filtración de la toxina tetánica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microfiltración

Para la obtención de la proteína tetánica una vez culminado su proceso de producción en fermentadores, es necesario realizar en primer lugar, la eliminación de los restos de bacterias producto de la lisis celular en el cultivo. Este proceso puede realizarse de diferentes maneras: usando centrifugas de flujo continuo, filtración convencional con cartuchos o membranas, o filtración usando la tecnología FFT. Esta tecnología consiste en someter al cultivo a un proceso de filtración de forma tangencial (no de forma directa como en el caso de la filtración convencional), lo cual permite que las membranas no se colapsen por el taponamiento prematuro producto de la formación de depósitos celulares que ocurren durante la interacción con la membrana (polarización), debido al limitado espacio que hay en los canales por donde circula el fluido. Con la FFT es posible utilizar mayores cantidades de volúmenes de producto por área de filtración, con velocidades constantes de flujo de trabajo en el tiempo. La incorporación de esta tecnología permite realizar el proceso de separación celular de forma más limpia, segura y en menor tiempo, en virtud que es posible conectar el equipo con Tecnología de FFT en un circuito cerrado con el fermentador y de esta manera minimizar los riesgos de contaminación del producto o del operario durante la manipulación del proceso, lo cual es una condición indispensable para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en la producción de Biológicos (8).

Para la realización de las pruebas de MF, se seleccionaron las membranas Supor (rango de trabajo desde 0.1 hasta 1.2 μ m), fabricadas en PES, formatos Medium Screen (MS) de 0.2 μ m, 0.65 μ m y 1000 kDa y Suspended Screen (SS) 0.2 μ m. Las membranas de polyetersulfona (PES) son membranas construidas con polímeros de PES pura. Este material permite eliminar partículas durante los procesos de filtración general y sus características hidrofílicas y de baja fijación de las proteínas las hacen especialmente apropiada para su uso en aplicaciones biomédicas (9). El formato MS permite el procesamiento de fluidos clarificados de mediana o baja visco-

sidad, en cambio el formato SS, permite el procesamiento de fluidos no clarificados como cosechas celulares provenientes de fermentadores, así como también soluciones con detritos o partículas no solubles y de alta viscosidad. El efecto de suspendido se crea incorporando al diseño de construcción del cassette, un espaciador de poliofelina (180 μ m), entre la malla de poliéster (Screen) y la membrana (9).

Los resultados del efecto del tiempo sobre el flujo de proceso (ver gráfico 1), mostraron una disminución proporcional del flujo de proceso a medida que transcurrió el tiempo de corrida, para todos los formatos de membranas probados. Ello es debido a la polarización de la membrana, lo cual disminuyó progresivamente sus capacidades de filtración, siendo el formato SS 0.2 μ m, el que mostró mejor comportamiento en el tiempo. Por otra parte, a medida que se incrementó la PTM, desde 0.25 hasta 2.25 Bar (ver gráfico 2), se observaron incrementos significativos en los flujos de proceso para las membranas formato MS de 0.2 y 0.65 μ m y SS 0.2 μ m, observándose un efecto de polarización cuando la PTM superó los 1.75 Bar, por lo que se estableció este valor para la PTM para futuros ensayos. Por otra parte, se observó un leve incremento del Flujo de Proceso para la membrana MS Omega de 1000 kDa, lo que indicó un comportamiento independiente entre el Flujo de Proceso y la PTM, pero con valores de Flujos de Proceso inferiores al resto de las membranas probadas. Ensayos realizados en el filtrado de la membrana MS 0.65 μ m mostraron presencia de células en el mismo, razón por la cual no se realizaron más ensayos con este formato de membrana.

Gráfico 1

Tétanos MF. Flujo de Proceso vs. Tiempo.
Toxina: 90Lf/ml, PTM 0.25 Bar, DP 0.5 Bar, 25 °C

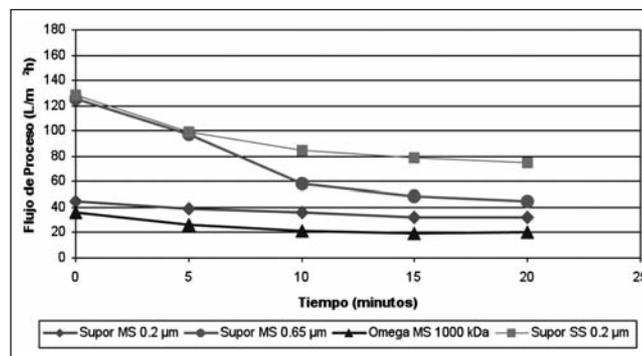
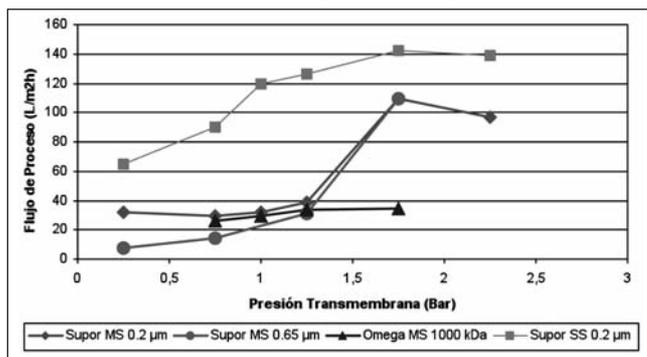


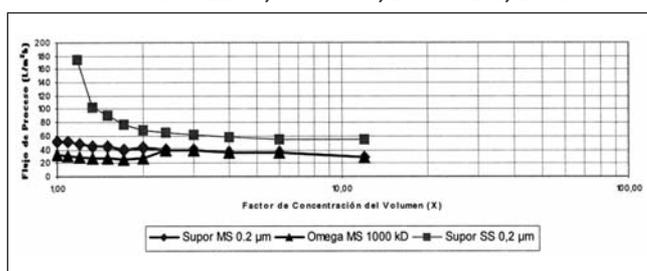
Gráfico 2
Tétanos MF. Flujo de Proceso vs. PTM.
 Toxina: 90 Lf/ml, DP 0.5 Bar, 25 °C



Para cada uno de los formatos de los filtros empleados en el proceso de MF, se establecieron las condiciones de PTM y DP en 1.75 y 0.5 Bar, respectivamente, a objeto de determinar cómo se afecta el Flujo de Proceso a medida que se va concentrando el producto en el Envase de Producto a filtrar, como consecuencia del retorno de las células al mismo. En el gráfico 3, se puede observar que para todos los formatos, a medida que se va concentrando el producto a filtrar, disminuye la capacidad de filtración, debido a la polarización de la membrana, no obstante, en todos los casos se obtuvo una concentración 12 veces el valor inicial.

Los resultados obtenidos indicaron que el cassette, formato MS 0.65 µm, fue rechazado por la presencia de restos celulares en el filtrado, debido a que la porosidad de la membrana no limita su paso a través de ella. Por otra parte, el cassette, formato MS Omega 1000 kDa, aunque presentó un flujo promedio de filtrado aceptable (31,58 L/m²h), también fue rechazado en virtud que no

Gráfico 3
Tétanos MF. Flujo de Proceso vs. Factor de Concentración del Volumen.
 Toxina: 90 Lf/ml, PTM 1.75, DP 0.5 Bar, 25 °C



hubo transmisión de la toxina tetánica hacia el filtrado, es decir hubo un 100% de retención de la proteína en el retenido. Esto indicó que el rango de la porosidad de la membrana es muy pequeño y no permitió el paso de la toxina a través del mismo. El cassette formato MS 0.2 µm, aunque presentó un flujo promedio de filtrado aceptable (38,37 L/m²h), también fue rechazado porque sólo permitió un 55% de transmisión de la toxina tetánica hacia el filtrado, reteniéndose y por ende perdiéndose, el 45% de la toxina. Esto se atribuye al tamaño de la toxina y el efecto de polarización de la membrana en el tiempo, los cuales a medida que interaccionan con la membrana se van depositando, limitando el proceso de filtración y por ende reteniendo la proteína. El cassette, formato SS 0.2 µm, presentó el mejor flujo promedio de filtrado (73,35 L/m²h), 100% de transmisión de la proteína hacia el filtrado y ausencia de restos celulares en el mismo, indicando que desde el punto de vista de la porosidad y compatibilidad, cumple con las especificaciones requeridas.

Estos resultados demostraron que la membrana, formato SS 0,2 µm, es la seleccionada para realizar el procedimiento de separación celular de la toxina tetánica. En este sentido y tomando en consideración los resultados obtenidos, se dimensionó el área de filtración para el equipo de MF de acuerdo a la siguiente formula:

Formula 1.-

$$\text{Área (m}^2\text{)} = \frac{\text{Volumen de procesamiento a escala industrial (L)}}{\text{Flujo medio en estudio piloto (L/hm}^2\text{)} \times \text{Tiempo deseado}}$$

Donde:

Volumen total a procesar en la nueva planta de producción de tétanos, considerando 50 L Inoculo, 500L Medio Fermentador, 5 lavados a razón de 20L cada uno 100 L, Total: **650 L**. Tiempo de procesamiento deseado: **3 h**. Flujo medio de trabajo estimado por este estudio para la membrana, formato SS 0.2 µm: 73.35 L/hm². Por lo tanto, el área de filtración calculada para el equipo de MF es de: **2,95 m²**, tomando un factor de seguridad del 20% de área, quedaría: **3.54 m²**. Entonces, y considerando que la máxima concentración posible a obtener de la toxina tetánica en bioreactores es 150 Lf/ml, el equipo de MF a ser adquirido por el INHRR para realizar el proceso de separación celular de la Toxina Tetánica, debe ser un

modelo de sistema de MF diseñado y construido para un área máxima de filtración de **20.00 m²**.

Ultrafiltración

Para la obtención de la proteína tetánica, una vez culminado el proceso de eliminación de los restos de bacterias producto de la lisis celular en el cultivo, es necesario concentrar y diafiltrar el medio líquido que contiene la toxina, a fin de eliminar, en primer lugar la presencia de otras proteínas, en particular las de bajo peso molecular, y en segundo lugar, realizar una primera etapa de purificación en la cual se sustituye el medio de cultivo por una solución amortiguadora estéril (8). Este proceso puede realizarse de diferentes maneras: usando filtración convencional con cartuchos o membranas, o filtración usando la tecnología FFT. Para la realización de las pruebas de UF, se seleccionaron las membranas Omega (rango de trabajo desde 1 kDa hasta 1000 kDa), fabricadas en PES, formato MS, diseñadas para fluidos clarificados de mediana o baja viscosidad y con porosidades de 50 y 70 kDa, considerando la relación de tres a cinco veces el peso molecular de la proteína a recuperar, la Toxina Tetánica, partiendo del filtrado obtenido en la prueba de microfiltración satisfactoria realizada, el cual presentó una concentración de Toxina Diftérica de 90 Lf/ml.

Los resultados del efecto del tiempo sobre el flujo de procesos (ver gráfico 4), mostraron un flujo de proceso estable durante el tiempo de corrida de 15 minutos para las dos membranas probadas. Por otra parte, a medida que se incrementó la PTM, desde 0.25 hasta 1.75 Bar (ver gráfico 5), se observaron incrementos significativos en el Flujo de Proceso para las dos membranas. Este comportamiento demostró que el medio líquido que contiene la toxina tetánica, no polarizó las membranas y permitieron el proceso de filtrado sin algún tipo de limitación, pues a medida que aumentó la PTM, aumentó proporcionalmente el flujo de proceso. Se estableció el rango de trabajo para el parámetro de la PTM, entre 1.5 y 1.75 Bar.

Para realizar el proceso de UF, se establecieron las condiciones de PTM en 1.75 Bar y DP en 0.5 Bar, con el fin de determinar como se afecta el Flujo de Proceso a medida que se va concentrando la Toxina Tetánica en el Envase de Producto a filtrar, por consecuencia del retorno de la Toxina al mismo. En el gráfico 6, se pudo observar que la membrana de 50 kDa mostró una leve disminución en su capacidad de filtración a medida que se fue

Gráfico 4
Tétanos UF. Flujo de Proceso vs. Tiempo.
Toxina: 90Lf/ml, PTM 0.25 Bar, DP 0.5 Bar, 25 °C

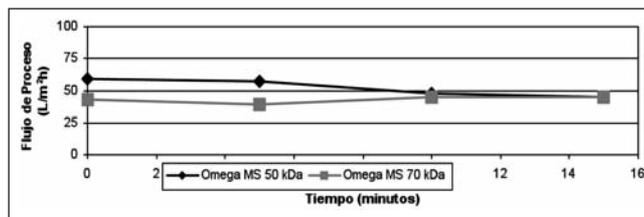
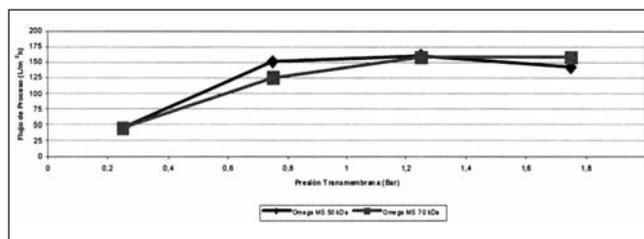
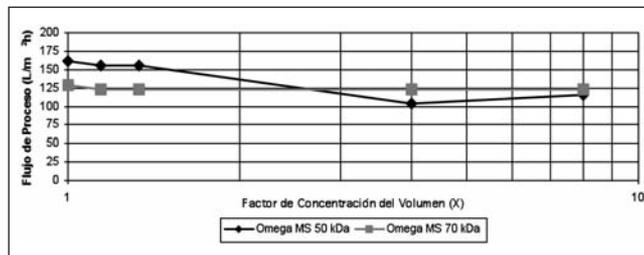


Gráfico 5
Tétanos UF. Flujo de Proceso vs. PTM.
Toxina: 90Lf/ml, DP 0.5 Bar, 25 °C



concentrando la toxina tetánica, contrario a la membrana de 70 kDa, la cual mostró un comportamiento muy estable durante el ensayo, aun cuando los valores finales de Flujo de procesos fueron similares. En ambos casos no se generó efecto de polarización y se logró alcanzar hasta un factor de concentración de 8X.

Gráfico 6
Tétanos UF. Flujo de Proceso vs. Factor de Concentración del Volumen.
Toxina: 90Lf/ml, PTM 1.25 Bar, DP 0.5 Bar, 25 °C



Los resultados obtenidos indicaron que ambas membranas presentaron Flujos Promedio de Filtrado similares (50 kDa, 106,7 L/m²h y 70 kDa, 104,4 L/m²h), 100% de recuperación de la toxina y no se detectó presencia de toxina tetánica en el filtrado. Aunque los Flujos Promedio de Filtrado fueron similares, la membrana

de 70 kDa, presentó una coloración levemente más clara respecto al retenido obtenido con la membrana de 50 kDa, además de una pureza antigénica superior (ver tabla 2 y figura 2), superando ambos resultados de pureza el mínimo valor de requerimiento establecido por la Organización Mundial de la Salud de 1000 Lf/mg de nitrógeno proteico (11) Esto quiere decir que no es necesario realizar etapas posteriores de purificación lo que implica una mejora significativa en los costos, tiempos y rendimientos de producción.

Tabla 2
Valores de Pureza Antigénica obtenidos a partir de la UF del producto por las diferentes membranas

Membrana UF	Pureza Antigénica (Lf/mg nitrógeno proteico)
Pall 50 KDa	1093,00
Pall 70 KDa	1458.3
TTp-143 (Control)	1682.69

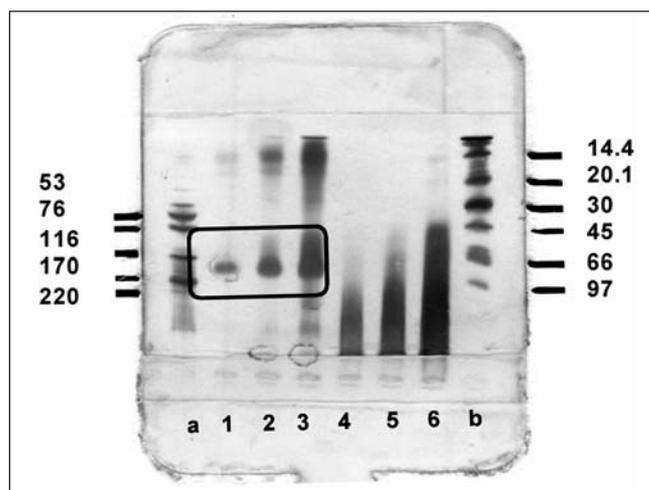


Figura 2. Electroforesis de la Toxina Tetánica obtenida después de la UF: a. Patrón de alto peso molecular (220 KDa) b. Patrón de bajo peso molecular (97 KDa). 1. Control toxoide tetánico purificado (TTp-143). 2. Membrana Pall 70 KDa. 3. Membrana Pall 50 KDa.

Estos resultados demostraron la potencialidad de ambas membranas en la eliminación de residuos provenientes del medio de cultivo y de otras proteínas con pesos moleculares cercanos al de la toxina tetánica durante los procedimientos de concentración y diafiltración de la toxina tetánica, confirmando los resultados obtenidos

por Cardoso (12), sin embargo, para los cálculos del dimensionamiento del área de filtración del equipo de UF, se consideraron los resultados obtenidos en la membrana de 50 kDa, en virtud que este corte molecular es el estándar utilizado en la producción de tétanos de otras Instituciones Internacionales similares (Instituto Finlay, Cuba e Instituto Butantan, Brasil). En este sentido y tomando en consideración los resultados obtenidos, se dimensionó el área de filtración para el equipo de UF de acuerdo a la formula 1, donde:

Volumen total a procesar en la nueva planta de producción de tétanos, considerando 650 L de MF y 15 lavados a razón de 20L cada uno 300 L, Total: **950 L**. Tiempo de procesamiento deseado: **3 h**. Flujo medio de trabajo estimado por este estudio para la membrana, formato MS 50 kDa: **106,7 L/hm²**. Por lo tanto, el área de filtración calculada para el equipo de UF es de: **2,97 m²**, tomando un factor de seguridad del 20% de área, quedaría: **3,56 m²**. Entonces, el equipo de UF a ser adquirido por el INHRR para realizar el proceso de concentración y diafiltración de la Toxina Tetánica, debe ser un modelo de sistema de UF diseñado y construido para un área máxima de filtración de **5.00 m²**.

Con los resultados obtenidos en este trabajo y la experiencia de los actuales procesos de producción en vacunas similares desarrollados en los Institutos Finlay (Cuba) y Butantan (Brasil), se probaron las membranas específicas usadas por dichas instituciones, tanto en MF como en UF de otras firmas comerciales reconocidas, obteniéndose resultados similares a las membranas seleccionadas en este trabajo (datos no reportados), lo que permitió identificar los formatos específicos de todas las membranas de las firmas comerciales reconocidas, que son compatibles con la producción de la toxina diftérica elaborada en el INHRR, a objeto de disponer de diferentes opciones técnicas y económicas en el momento de adquirir dichas membranas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Aggerbeck H and Heron I. Detoxification of diphtheria and tetanus toxin with formaldehyde. Detection of protein conjugates. *Biologicals*. 1992; 20: 109-115.
- (2) Rappuoli R. New and improved vaccines against diphtheria and tetanus. Chapter 1 In: Woodrow, G.C., Levine, M. M. *New generation vaccines*. Marcel Dekker, Inc., New York 1990: 251-268.

- (3) Santiago JG, Zamora N, Ibarz MT y Pombo M. Evaluación y mejoramiento del aspecto físico de las Vacunas Pertussis y DPT elaboradas en el INHRR. Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel. 1998; 29: 41-49.
- (4) Luciani LF. Elaboración de la toxina tetánica y conversión en toxoide. Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel. 1968. I (1): 7-12.
- (5) Ramon G. Flocculation test for assaying toxin, toxoid and antitoxin. Compt. Rend. Soc. Biol. 1992; 86: 711-712
- (6) Leenaars PPA, Kersten GFA, de Bruijn MLH, Hendriksen CFM. An in vitro approach in quality control of toxoid vaccines. Vaccine. 2001; 19: 2729-2733
- (7) USP 31. Determinación de pureza antigénica por microkjeldahl en toxoides tetánicos y diftéricos purificados. Volumen 1, Método 2, 2008, p. 171.
- (8) Affonso SM, Vancetto MDC, Fratelli F, Pral MM, Oliveira JM, y Gondo H. Purificación industrial de toxoide tetánico por by Gel Filtration. Bol. Biotecnol. 1992; 3: 11-16.
- (9) Howel JA, Sánchez V, Field RW. Membranes in bioprocessing: theory and applications. Chapman & Hall. London. 1993; 203-242.
- (10) Mulder M. Membrane processes. Chapter VI. In: Basic principles of membrane technology, second edition, Kluwer Academic Publishers, 1996; 280-306.
- (11) World Health Organization. Manual for the production and control of vaccines. Tetanus Toxoid. 1977b. (BLG/UNDP/77.1. Rev 1).
- (12) Cardoso D. Paquete tecnológico para la obtención de vacunas bacterianas con un enfoque de proceso unitario. Tesis Doctoral, Instituto Superior Politécnico, Cuba. 2000.